

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VLIV SCHOPNOSTI AKUMULACE PHA NA ODOLNOST  
BAKTERIÍ VŮČI BAKTERIOCIDNÍM LÉČIVŮM**

INFLUENCE OF PHA ACCUMULATION ON RESISTANCE OF BACTERIA AGAINST SELECTED  
ANTIBACTERIAL DRUGS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Vendula Chatrná

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

**BRNO 2018**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1198/2017  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Vendula Chatrná**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název bakalářské práce:

Vliv schopnosti akumulace PHA na odolnost bakterií vůči bakteriocidním léčivům

### Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat rešerši na zadné téma
2. Experimentálně posoudit vliv schopnosti akumulace PHA na odolnost bakterií vůči vybraným léčivům

### Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Vendula Chatrná  
student(ka)

-----  
doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá vlivem bakteriocidních léčiv na bakterii kmene *C. necator* H16 a jejímu mutantnímu kmenu PHB<sup>-4</sup>. Kmen H16 je schopen akumulace polyhydroxyalkanoátů (PHA) ve formě granulí, zatímco kmen PHB<sup>-4</sup> tuto schopnost postrádá. Teoretická část bakalářské práce se zaměřuje na vliv antibiotik na bakterie obecně a možnosti stanovení citlivosti mikroorganismů vůči antimikrobiálním látkám. V experimentální části byl testován vliv tří vybraných antibiotik (nisin, streptomycin a penicilin) na oba kmeny. Stanovena byla viabilita bakterií pomocí plotnové metody a průtokového cytometru. Dále byly použity antimikrobiální testy, konkrétně agarová difúzní metoda a bujónová diluční metoda. Ukázalo se, že produkce PHA snižuje odolnost buněk vůči antimikrobiálním látkám, protože kmen *C. necator* H16 je citlivější vůči působení streptomycinu a penicilinu než kmen *C. necator* PHB<sup>-4</sup>.

## Abstract

The aim of this bachelor thesis was to study the effect of bactericidal drugs on bacteria from the genus *C. necator* H16 and its mutant genus PHB<sup>-4</sup>. The genus H16 shows ability to accumulate polyhydroxyalkanoates (PHA) in the form of granules while the genus PHB<sup>-4</sup> lacks to show this ability. The theoretical part of the bachelor thesis is focused on the effect of antibiotics on bacteria in general and the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial substances. The effect of three specific antibiotics (nisine, streptomycin and penicillin) on both bacterial strains was tested in the experimental part. The viability of bacteria was determined by the spread plate method and flow cytometry. Agar diffusion test and broth microdilution test were used to test the susceptibility of bacteria. It was concluded that the accumulation of PHA decreases the tolerance of bacteria to antimicrobial substances because the genus *C. necator* H16 is more susceptible to streptomycin and penicillin than the strain *C. necator* PHB<sup>-4</sup>.

## Klíčová slova

*Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup>, polyhydroxyalkanoáty (PHA), viabilita, antimikrobiální látky, nisin, penicilin, streptomycin, průtoková cytometrie, antimikrobiální testy

## Keywords

*Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup>, polyhydroxyalkanoates (PHA), viability, antimicrobial substances, nisine, penicillin, streptomycin, flow cytometry, antimicrobial tests

CHATRNÁ, V. *Vliv schopnosti akumulace PHA na odolnost bakterií vůči bakteriocidním léčivům*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 40 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana VUT.

.....  
Vendula Chatrná

### **Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat vedoucímu své bakalářské práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, PhD. za odborné vedení a cenné rady při psaní teoretické části bakalářské práce a zpracování výsledků. Můj obrovský dík patří Ing. Evě Slaninové za pomoc a dozor při práci v laboratoři a za rady při zpracování výsledků. Dále bych ráda poděkovala Ing. Lucii Müllerové za pomoc a obětovaný čas při zpracování výsledků z průtokové cytometrie.

# OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Bakterie	8
2.1.1	Stavba a struktura	8
2.1.2	Stresová adaptace bakterií	11
2.2	Antibiotika	11
2.2.1	Historie	12
2.2.2	Rezistence vůči antibiotikům	12
2.2.3	Citlivost bakterií vůči antibiotikům	12
2.2.4	Mechanismus účinku antibiotik a jejich selektivita	14
2.2.5	Použitá antibiotika	16
2.3	Modelový mikroorganismus	17
2.3.1	<i>Cupriavidus necator H16</i>	17
2.4	Polyhydroxyalkanoáty	18
2.4.1	Struktura a vlastnosti	18
2.4.2	Využití	18
2.5	Metody pro stanovení citlivosti bakterií vůči bakteriocidním léčivům	19
2.5.1	Kvalitativní metody	19
2.5.2	Kvantitativní metody	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1	Použité bakterie, chemikálie a přístroje	21
3.1.1	Použité bakterie	21
3.1.2	Použité chemikálie	21
3.1.3	Použité přístroje	21
3.2	Kultivace bakterií	21
3.2.1	Příprava inokula	22
3.2.2	Příprava minerálního média	22
3.2.3	Příprava agarových misek	22
3.3	Příprava antibiotik	22
3.4	Použité metody	23
3.4.1	Stanovení viability plotnovou metodou	23
3.4.2	Průtoková cytometrie	23
3.4.3	Agarová difúzní metoda	24
3.4.4	Bujónová diluční metoda	24
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	25
4.1	Stanovení viability plotnovou metodou	25
4.2	Stanovení viability průtokovou cytometrií	26
4.3	Agarová difúzní metoda	28
4.4	Bujónová diluční metoda	29

5	ZÁVĚR	35
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	36
7	PŘÍLOHY	39

# 1 ÚVOD

Bakterie jsou na Zemi nejrozšířenějšími organismy, a díky své přizpůsobivosti osídlily všechny kouty planety. Existuje ale mnoho způsobů, jakými lze dostat bakterie do stádia stresu. Jedním z nich je působení bakteriocidních léčiv na bakterie. Ty se rozdělují na grampozitivní a gramnegativní, a mají rozdílné složení, a především strukturu buněčné stěny. Tato rozdílnost je zásadní při účinku antimikrobiálních léčiv. Pokud se použije látka, která na danou bakterii nemá žádný vliv, je léčba bezvýznamná. Další nepříjemná skutečnost je ta, že bakterie mají schopnost získat rezistenci na dané antibiotikum.

Rezistenci bakterií vůči ATB lze považovat za jeden z nejzávažnějších problémů v současné medicíně, a to z důvodu stoupající odolnosti bakteriálních patogenů k účinku antibiotik. S tím samozřejmě souvisí stoupající morbidita a mortalita, a to včetně ekonomických nákladů.

Některé bakterie jsou schopny syntézy tzv. polyhydroxyalkanoátů (PHA), které využívají jako zásobní látky. Jsou to biomateriály, které mají vlastnosti podobné plastům, ale navíc jsou biokompatibilní a biodegradabilní. Pro bakterie mají velký význam při stresové odpovědi. Díky tomu, že PHA jsou zásobní látkou, tak jsou bakterie schopny je využít k přežití při dlouhodobějším vystavení stresu.

Cílem práce je studium účinku antibiotik na bakterii schopnou produkce PHA a jejímu mutantnímu kmenu, který tuto schopnost nemá, pomocí stanovení viability a antimikrobiálních testů.



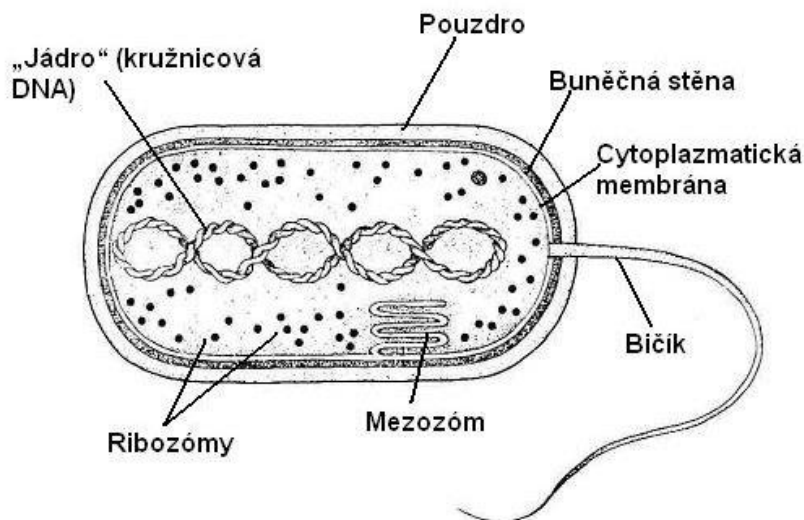
## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Bakterie

Bakterie se řadí mezi prokaryotické buňky, které jsou evolučně starší než buňky eukaryotické. Prokaryotické buňky jsou pouze jednobuněčné organismy. Jejich velikost se pohybuje v mikrometrech. [1]

#### 2.1.1 Stavba a struktura

Povrch bakteriální buňky je pokrytý buněčnou stěnou, pod kterou se nachází cytoplazmatická membrána, která uzavírá cytoplazmu (vlastní buněčnou hmotu). V cytoplazmě se vyskytuje jaderná hmota (nukleoid) tvořená jedinou uzavřenou molekulou deoxyribonukleové kyseliny. Mezi další základní struktury obsažené v cytoplazmě patří ribozomy, inkluze, plazmidy a mezozómy. Dále se mohou na povrchu buněk vyskytovat bičíky, díky kterým realizuje buňka pohyb. Celý živý obsah buňky se nazývá protoplast. [2]



**Obrázek 1:** Struktura bakteriální (prokaryotické) buňky [3]

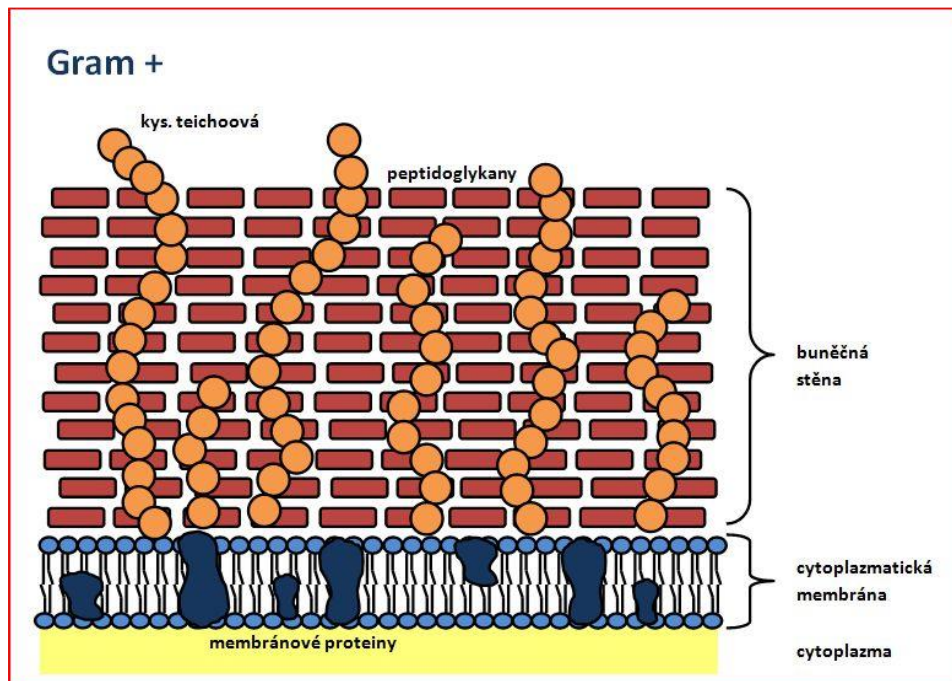
##### 2.1.1.1 Buněčná stěna

Na povrchu buňky se nachází buněčná stěna, která představuje pevný obal prokaryotické buňky. Buněčná stěna funguje jako permeabilní membrána (je volně propustná pro vodu a v ní rozpuštěné živiny). U některých bakterií je buněčná stěna kryta pouzdem z bílkovin nebo polysacharidů (gramnegativní bakterie, např. *Escherichia coli*).

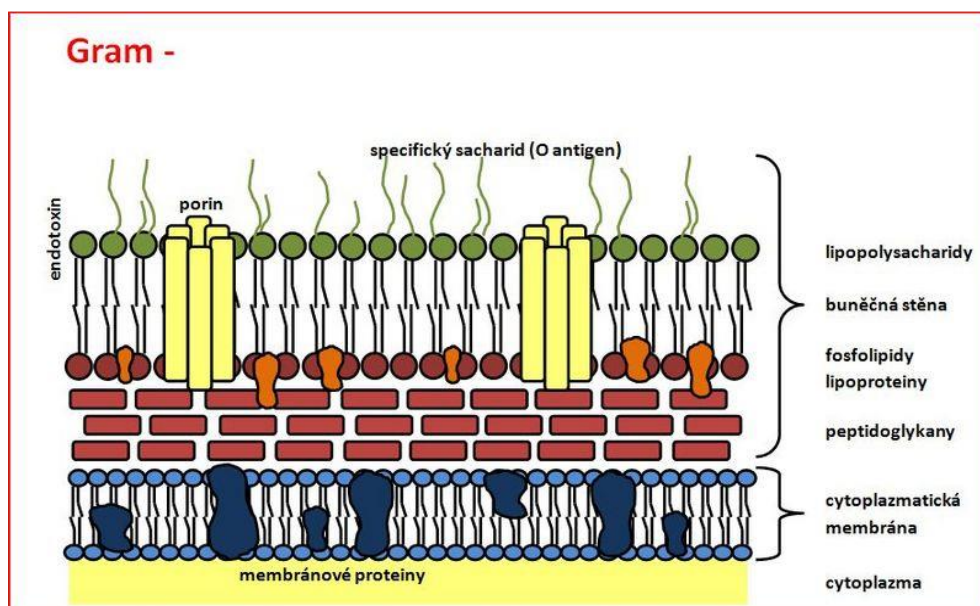
Buněčná stěna uděluje buňce tvar a mechanicky ji ochraňuje před vlivy vnějšího prostředí. Základní složkou buněčné stěny je heteropolymer peptidoglykan (murein), který je vyplněn teichoovou kyselinou. Peptidoglykan tvoří dlouhá rovnoběžně uložená vlákna polysacharidu glykanu. Tato vlákna spojují krátké peptidové řetězce. Celá buňka je obklopena touto peptidoglykanovou sítí. [1]

Bakterie se podle struktury buněčné stěny dělí na grampozitivní a gramnegativní (existují i bakterie bez buněčné stěny – mykoplazmata). Grampozitivní bakterie jsou charakteristické především hustou, odolnou, trojrozměrnou vrstvou peptidoglykanu (cca 20 nm). Jako složku

buněčné stěny mohou mít kyselinu teichoovou a/nebo polysacharidy. Oproti tomu gramnegativní bakterie mají pouze tenkou vrstvu peptidoglykanu, která obsahuje kyselinu muramovou (vnitřní membrána). Navíc ale vlastní i vnější membránu, tvořenou fosfolipidovou dvojvrstvou, do které jsou začleněny lipopolysacharidy a lipooligosacharidy (viz obr. 3). Tato membrána má také funkci endotoxinu (=vnitřní jed), který se uvolňuje až po smrti buňky a po rozpadu vnější membrány. Mezi oběma membránami se nachází tzv. periplazmatický prostor. Buněčná stěna gramnegativních bakterií je chemicky odolnější, ale mechanicky křehčí než buněčná stěna bakterií grampozitivních. [4]



**Obrázek 2:** Složení buněčné stěny u grampozitivních bakterií [5]



**Obrázek 3:** Složení buněčné stěny u gramnegativních bakterií [5]

### **2.1.1.2 Cytoplazmatická membrána**

Cytoplazmatická membrána je charakterizována jako tenký semipermeabilní (polopropustný) obal, který tvoří hranici mezi protoplastem a vnějším prostředím (buněčná stěna je oproti tomu propustná – viz kap. 2.1.1.1). Cytoplazmatická membrána je složená z fosfolipidů a bílkovin, konkrétně představuje sídlo pro enzymy dýchacího řetězce, systém oxidační fosforylace, enzymy syntézy a hydrolýzy fosfolipidů a konečné fáze syntézy složek buněčné stěny a pouzdrových obalů. Role cytoplazmatické membrány tkví v zajištění transportu látek do buňky a z buňky pomocí bílkovinných přenašečů (např. exportér, který zajišťuje přechod látek z buňky do vnějšího prostředí). [6]

Zvláštní typ vchlípeniny z cytoplazmatické membrány se jmenuje mezozóm. Ten vzniká jako produkt činnosti člověka při přípravě preparátu chemickou fixací, proto nepatří mezi základní struktury prokaryotické buňky. [4]

### **2.1.1.3 Cytoplazma**

Cytoplazma tvoří viskózní, koncentrovaný roztok malých i velkých molekul. Celý prostor buňky je vyplněn právě cytoplazmou, jak lze vidět na obr. 1. [1]

Po chemické stránce je cytoplazma koloidním roztokem globulárních bílkovin, ve kterém se nachází rozpuštěné ribonukleové kyseliny, aminokyseliny, nukleotidy, soli organických kyselin, vitaminy a mimo jiné i rezervní látky (volutin a glykogen). Lze v ní nalézt mnoho enzymů (např. polymerázy), jež katalyzují především syntézu aminokyselin, nukleotidů, polysacharidů a nukleových kyselin. [7]

### **2.1.1.4 Jádro**

Nukleoid neboli jaderná hmota je do kruhu stočená molekula DNA. Velikost tohoto jediného chromozomu je přibližně tisíckrát větší než velikost samotné buňky, a proto je v buňce poskládaná do smyček. Nukleoid není od cytoplazmy oddělen membránou a nedělí se mitoticky.

Kromě této DNA, která tvoří jádro, obsahují mnohé bakterie i DNA ve formě malých, do kruhu uzavřených molekul, které se nazývají plazmidy. Jejich přítomnost není nezbytná pro existenci buňky, ale mohou obsahovat genetickou informaci důležitou pro život buňky. Plazmidy mají schopnost pronikat z buňky do buňky díky tzv. konjugaci (spájení). Konjugací se míní dočasné spojení mezi dvěma buňkami, kdy dojde k výměně DNA (tato genetická informace je pro bakterii velmi často výhodná, protože může obsahovat např. rezistenci vůči antibiotikům, viz kap. 2.2.2). [1, 4]

### **2.1.1.5 Ribozomy**

Ribozomy jsou tělíška nacházející se v cytoplazmě. Jejich podstatou je syntéza bílkovin. Skládají se ze dvou podjednotek – malé (sedimentační koeficient 30S) a velké (sedimentační koeficient 50S). Každá podjednotka je tvořena z ribosomální RNA (rRNA) a bílkovin. Vazebná místa se nachází na velké podjednotce a jsou významná v genové expresi, zejména při translaci. [1]

### 2.1.2 Stresová adaptace bakterií

Bakterie mohou být vystaveny mnoha stresovým faktorům, jako je například hladovění a špatné fyzikální, chemické nebo biologické podmínky. Všechny tyto podmínky jsou proměnné, proto i bakterie mají různé mechanismy, jak se s nimi vyrovnat. Působení stresových faktorů a následný vznik stresu lze podle závažnosti situace rozdělit na čtyři stupně: nepatrný stres (růst není zpomalen a bakterie se adaptuje na nové podmínky), těžký stres (rychlost růstu je výrazně snížena, ale bakterie je schopna se se změnou vyrovnat), extrémní stres (přestává růst, bakterie spotřebovává zásoby, aby přežila) a letální stres (spotřebují se zásobní látky až do vyčerpání všech rezerv). [8, 9]

#### 2.1.2.1 Teplotní stres

Mikroorganismy lze podle růstové teploty rozdělit do několika skupin:

- Psychrofilů (kolem 15 °C),
- psychrotrofy (20 – 30 °C),
- mezofilů (kolem 37 °C) – zde je stresová odpověď prostudována nejlépe (*Escherichia coli*), nedochází téměř ke zpoždění v adaptaci na jinou rychlost růstu, nedochází k vyvolání tepelné šokové odpovědi ani k odpovědi šoku z chladu,
- termofilů (kolem 60 °C),
- hypertermofilů (80 °C a více).

Bakterie žijící volně se musí přizpůsobit jiným teplotním změnám než například bakterie žijící v oceánech, protože se nacházejí ve velice odlišných podmínkách. [10]

#### 2.1.2.2 Osmotický stres

Mechanismus osmotické stresové tolerance určuje, zda bakterie přežije nebo bude růst, protože osmotický stres velmi ovlivňuje strukturu, chemii a fyziku bakterií. [11]

Jsou-li bakterie v prostředí, kde je koncentrace rozpuštěných látek odlišná od složení cytoplazmy bakterií, lze pozorovat různé osmotické jevy, jejichž příčinou je difúze, která zprostředkovává vyrovnání koncentrací rozpuštěných látek mezi dvěma různými prostředími.

Pokud je koncentrace rozpuštěných látek v okolí buňky stejná jako koncentrace látek uvnitř buňky, jedná se o izoosmotické prostředí. Nedochází k přítoku ani odtoku vody mezi buňkou a prostředím.

Pokud se buňka nachází v prostředí s vyšší koncentrací rozpuštěných látek, voda z buňky odtéká a nastává dehydratace. Následuje plazmolýza (smrštění objemu cytoplazmy). [12, 13]

#### 2.1.2.3 Oxidační stres

Pro většinu živých organismů (výjimku tvoří malá skupina anaerobních bakterií) je kyslík nezbytný. Využívá se na tvorbu energie ve formě ATP během oxidativní fosforylace. Je-li bakteriální buňka vystavena oxidativnímu stresu, aktivuje se několik metabolických drah zapojených do oxidačního stresu odpovědi. Některé molekuly v buňce pomáhají udržovat intracelulární prostředí nebo odstraňují chemicky reaktivní formy kyslíku. [13]

## 2.2 Antibiotika

Antibiotika jsou látky, jež produkují bakterie či houby. Jejich účelem je především terapie bakteriálních onemocnění (například angína, zápal plic, tyfus a dříve mor). Využívají se i pro

profylaktické použití, což znamená, že jsou podávána pacientovi před chirurgickou nebo ortopedickou operací. Tlumí růst mikroorganismů nebo je rovnou zabíjí, a to už při velmi nízkých koncentracích. Termín antibiotika se používá pro všechny, i synteticky získané, látky se silným antibakteriálním účinkem. [14, 15]

Po chemické stránce jsou antibiotika produkované bakteriemi polypeptidy a antibiotika produkované aktinomycety (grampozitivní bakterie žijící v půdě) mají mnohem pestřejší chemickou strukturu (polypeptidy, deriváty sacharidů, makrolidové a makrocyclické látky, heterocyclické látky, chinony, aromatické sloučeniny). Produkce jednoho antibiotika je schopno i více druhů mikroorganismů, ale naopak existují i kmeny stejného druhu schopné produkce rozdílných antibiotik (např. *Streptomyces*). [16]

### 2.2.1 Historie

V roce 1928 objevil skotský lékař, známý svým objevem baktericidních účinků lysozymu, Sir Alexander Fleming penicilin. Penicilin získal z plísně *Penicillium notatum*. Nebyl ale schopen sloučeninu izolovat v čisté podobě, kdy by bylo možné jej podávat nemocným lidem.

Na přelomu třicátých a čtyřicátých let se k Flemingovu poznatku vrátili vědci na univerzitě v Oxfordu, kterým se čistou látku podařilo vyizolovat. První využití našel tento lék během druhé světové války. Po konci války se používání penicilinu rozšířilo po celém světě.

Avšak s nadměrným používáním penicilinu docházelo k vytvoření rezistence bakterií vůči tomuto léku. Proto byla koncem padesátých a začátkem šedesátých let vyvinuta nová antibiotika odolná proti enzymu betalaktamáze. Nicméně opět následovalo objevení druhů rezistentních vůči těmto antibiotikům, a to konkrétně kmen stafylokoků. Nejnovější superezistentní kmen nese metalobetalaktamázu, a prozatím je rezistentní proti nejsilnějším antibiotikům. [17]

### 2.2.2 Rezistence vůči antibiotikům

Bakterie mají jednu důležitou vlastnost, a tou je právě zvyšování odolnosti vůči antimikrobiálním látkám. Rezistenci bakterií lze definovat jako schopnost bakterií přežít účinek inhibiční koncentrace daného antibiotika. Rezistence se dělí na vrozenou a získanou. Vrozená (primární) závisí na reakci na dané antibiotikum, aniž by se s ním bakterie setkaly již dříve. Bakterie jsou rezistentní, protože jim pro dané antibiotikum chybí cílová struktura, nebo jsou produkovány inaktivujícími enzymy. Získaná rezistence je následek selekčního tlaku prostředí a vzniká fenotypickou adaptací nebo genetickými změnami. [18, 19]

Rezistence může být získána například chromozomální mutací nebo vlivem extrachromozomální plazmidové informace. Chromozomální mutace se vyskytují spontánně s různou frekvencí, nejsou závislé na přítomnosti léčiva. Plazmidy obsahují přenosné informační štěpy DNA, které jsou schopny kódovat různé mechanismy rezistence, proto jsou rozhodujícím faktorem na přenosnou rezistenci. Plazmidy je možné přenášet uvnitř druhu i mezidruhově. [14]

### 2.2.3 Citlivost bakterií vůči antibiotikům

Základním požadavkem na léčbu antibiotiky je optimální antimikrobiální účinek za minimální toxicity na hostitele. Antibiotikum se naváže na bakterii, čímž ji zneškodní a následně dojde

k rozpadu buňky (lyzi). Antibiotika mohou ovlivňovat jak struktury bakterií, tak jejich metabolismus. Struktury bakterií napadají tak, že ničí jejich buněčnou stěnu nebo cytoplazmatickou membránu. [14]

### **2.2.3.1 Specifita antibiotik**

Mezi důležité vlastnosti antibiotik patří beze sporu jejich selektivita a specifita. Dalším důležitým faktorem účinku antibiotik je koncentrace, v jaké jsou podány. Rozdělení antibiotik podle specifity (intenzity jejich účinku) je následující:

- **Baktericidní antibiotika**

Antibiotika s baktericidním účinkem usmrcují bakteriální buňku. Působí ireverzibilně a rychleji než antibiotika bakteriostatická, která se projeví až za 3-4 dny. Tato antibiotika působí již od prvního dne užití. Do této skupiny se řadí např. peniciliny, polymyxiny a chinolony. [15]

- **Bakteriostatická antibiotika**

Reverzibilně zastavují růst a množení bakterií. Následně záleží na imunitním systému jedince, jak se s bakterií vypořádá. Antibiotika pouze sníží metabolismus (růst a množení) bakteriální buňky. Jsou používána častěji než antibiotika baktericidní, a to z důvodu ceny a redukce vedlejších účinků. Patří sem například tetracykliny nebo sulfoamidy. [15]

- **Úzkospektrá antibiotika**

Jak už plyne z názvu skupiny, tato antibiotika působící na určité původce (stafylokoky, pseudomonády, mykobakterie, tuberkulózy) lze označit jako úzkospektrá. Používají se pouze v případě, je-li známo, jakým mikroorganismem je člověk nakažen. [15]

- **Širokospektrá antibiotika**

Oproti úzkospektrým antibiotikům jsou schopna antibiotika širokospektrá zabít široké spektrum mikroorganismů, včetně užitečných bakterií (symbiotická mikroflóra na povrchu sliznic). Aplikují se, pokud není známo, jaký mikroorganismus jedince napadl nebo v případě akutního onemocnění, kde se z časových důvodů předepisují přímo širokospektrá antibiotika. [15]

- **Minimální inhibiční koncentrace (MIC)**

Minimální inhibiční koncentraci lze definovat jako nejmenší naměřené množství (koncentraci) antibiotika, které inhibuje růst a množení bakterií *in vitro*. Mezi nejdůležitější faktory stanovení MIC patří standardizace testovacích podmínek, neboť existují vlivy, které mohou zapříčinit nepřesnosti. Těmito vlivy mohou být například fyziologický stav inokula, druh testovací půdy, doba a teplota inkubace. [14]

- **Minimální baktericidní koncentrace (MBC)**

U minimální baktericidní koncentrace se jedná o nejnižší naměřenou koncentraci antibiotika *in vitro*, která usmrtí bakteriální kulturu během inkubace v tekutém médiu po dobu 24 hodin. U velmi silných antibiotik (baktericidní antibiotika – např. penicilin) je rozdíl mezi minimální inhibiční a minimální baktericidní koncentrací minimální. [14]

## 2.2.4 Mechanismus účinku antibiotik a jejich selektivita

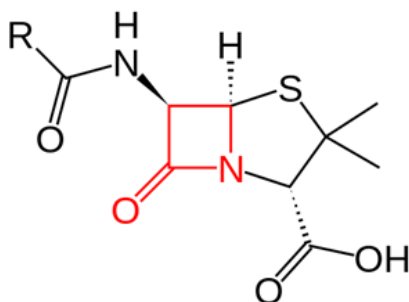
Selektivitou se rozumí, že podané antibiotikum účinkuje pouze na určité druhy patogenů a ničí je bez poškození jedince. Vybírá si tedy specifická místa ve struktuře bakteriální buňky.

Antibiotika je možné rozdělit podle mechanismu účinku do 4 velkých skupin, které pokryjí mechanismy účinků antibiotik. V rámci těchto skupin se dále dělí do menších skupin podle chemické struktury, která nese konkrétní farmakologické vlastnosti: [14]

### I. Antibiotika ovlivňující buněčnou stěnu

Mezi antibiotika, která ovlivňují buněčnou stěnu patří **beta-laktamová antibiotika**, do kterých se řadí penicilin, s nímž se v této bakalářské práci pracovalo. Tato skupina je charakterizována beta-laktamovým kruhem, který obsahuje jeden atom dusíku a tři atomy uhlíku (viz obr. 4). [20]

Beta-laktamový kruh je základní podmínkou účinku těchto antibiotik, neboť jejich mechanismus účinku spočívá v selektivní inhibici syntézy bakteriální stěny. V bakteriální buňce se beta-laktamy vážou na PBPs (penicillin-binding proteins, proteiny vázající penicilin), které představují buněčné receptory. Jakmile se beta laktamy navážou na PBPs, dochází v bakteriální buňce k inhibici syntézy buněčné stěny, a bakteriální buňka se nedělí a rozpadá se. Tento kruh je možné enzymaticky štěpit pomocí specifických enzymů zvaných beta-laktamázy a následkem tohoto štěpení ztrácí struktura svůj antibiotický efekt. Zástupci této skupiny jsou kromě penicilinů také cefalosporiny, karbapenemy a monobaktamy. [20]

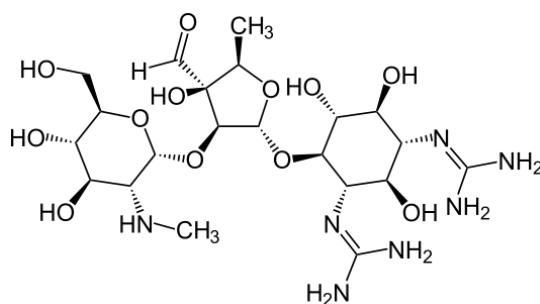


**Obrázek 4:** Chemická struktura penicilinu se zvýrazněným beta-laktamovým kruhem

### II. Antibiotika ovlivňující proteosyntézu

Tvorba proteinů je podmínkou života, tudíž antibiotika patřící do této skupiny jsou baktericidní (viz kap. 2.2.3.1). Do této skupiny patří **aminoglykosidová antibiotika**, se kterými se v rámci experimentální části této práce také pracovalo (konkrétně se zástupcem streptomycinem). Tato antibiotika jsou širokospektrá a z chemického hlediska se jedná se o trisacharidy až tetrasacharidy. Obsahují aminocyklitolový kruh, ke kterému jsou připojeny aminosacharidy (viz obr. 5). Mechanismus účinku se zakládá na inhibici proteosyntézy na 30S podjednotce ribozomu. A tím brání vzniku iniciačních komplexů ( N-formylmethioninu), od kterých se následně syntéza bílkovin vyvíjí. [20]

Rozdělují se dle způsobu jejich aplikace na antibiotika pro systémové použití (gentamycin, tobramycin, netilmicin, amikacin) a antibiotika pro lokální použití (neomycin, kanamycin, spektinomycin, streptomycin, atd.). Naneštěstí jsou u aminoglykosidových antibiotik časté nežádoucí účinky, po perorálním podání se většinou špatně vstřebávají, proto je nutné je podávat parenterálně. [15, 21]



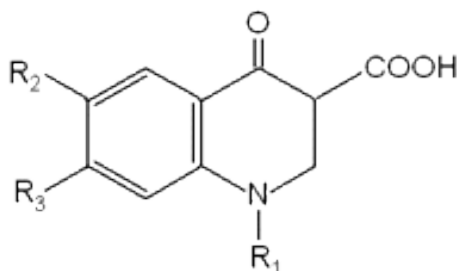
**Obrázek 5:** Chemická struktura aminoglykosidových antibiotik (konkrétně streptomycinu)

### III. Antibiotika ovlivňující syntézu nukleových kyselin

Antibiotika, která mají vliv na syntézu nukleových kyselin se rozdělují na inhibitory RNA polymerázy a inhibitory DNA gyrázy (enzym, který uspořádává molekulu DNA), do kterých patří mj. **chinolony**. Výsledný účinek je baktericidní. Tato antibiotika se podávají perorálně a mají schopnost dobře pronikat do všech tkání. Nežádoucí účinky jsou méně časté.

Chinolony jsou rozděleny do několika generací:

- 1.generace: úzké spektrum zahrnující pouze enterobakterie (např. kyselina nalidixová),
  - 2.generace: rozšíření spektra na enterobakterie i na  $G^+$  koky (např. norfloxacin),
  - 3.generace: rozšíření spektra proti pneumokokům (např. sparfloxacin),
  - 4.generace: zesílená aktivita proti  $G^+$  kokům a některým anaerobům (např. moxifloxacin).
- [21, 22]

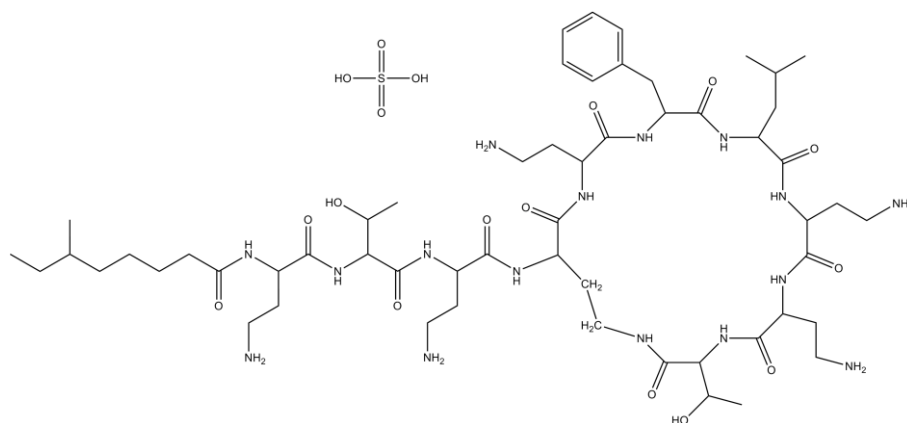


**Obrázek 6:** Obecná chemická struktura chinolonu ( $R_2$  nebo  $R_3 = F$ )

### IV. Antibiotika ovlivňující cytoplazmatickou membránu

Mezi antibiotika, která narušují cytoplazmatickou membránu patří například azoly, polyeny a **polymyxiny**. Polymyxiny jsou antibiotika používaná proti gramnegativním bakteriím. Jsou známy polymyxiny B a E (kolistin). Nejčastěji působí tak, že rozbíjí cytoplazmatickou membránu, což je realizováno průchodem polymyxinů mureinovou vrstvou buněčné stěny, čímž naruší cytoplazmatickou membránu a z bakteriální buňky začne unikat cytoplazma. Polymyxiny jsou produkovány grampozitivními bakteriemi (*Paenibacillus polymyxa*). Nevýhodou je jejich neurotoxicita a nefrotoxicita, tudíž se užívají pouze v případě neúčinnosti jiných antibiotik. [23]





**Obrázek 7:** Chemická struktura Polymyxinu B

## 2.2.5 Použitá antibiotika

### 2.2.5.1 Penicilin

Jak již bylo zmíněno v kap. 2.2.3 penicilin patří mezi beta-laktamová antibiotika, která v molekule obsahují beta-laktam, což je z chemického hlediska cyklický amid tvořený 4atomovým kruhem (viz obr. 4). A právě tento kruh je zodpovědný za antibiotickou aktivitu těchto látek. Mechanismus účinku spočívá v útlumu syntézy peptidoglykanů buněčné stěny bakterií. Penicilin působí baktericidně jen na bakterie v exponenciální fázi. [16]

Rozsah rezistence závisí na obsahu peptidoglykanu v buněčné stěně, kdy u grampozitivních bakterií je ho více než u gramnegativních (viz kap. 2.1.1.1). Proto penicilin působí zejména na grampozitivní bakterie.

Penicilin patří mezi oblíbená antibiotika díky baktericidnímu účinku, dobré snášenlivosti, širokému terapeutickému rozmezí, možnosti stupňovat účinek pomocí inhibitorů betalaktamáz. Další výhodou je, že nemá téměř žádný vliv na vznik rezistence během léčby. Mezi jeho nevýhody lze jistě zařadit fakt, že nemá dostatečně široké spektrum účinku, které je nezbytné pro antibiotickou léčbu. Dále je to nedostatečná odolnost vůči mnohým betalaktamázám. [24]

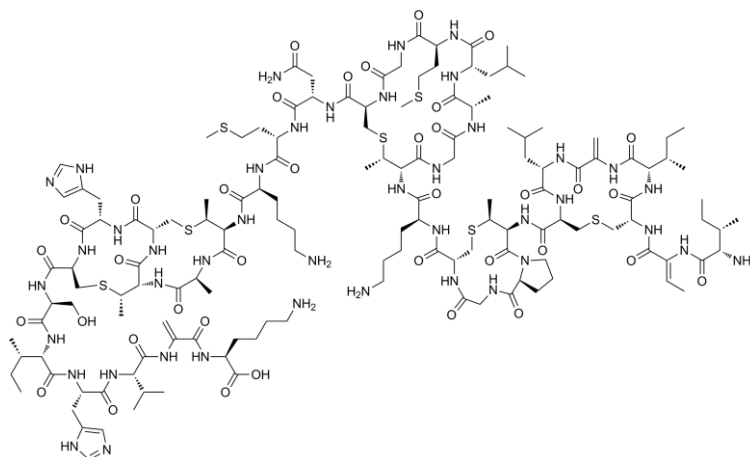
### 2.2.5.2 Streptomycin

Streptomycin patří mezi aminoglykosidová antibiotika (viz obr. 5), působí baktericidně vůči bakteriím v růstové fázi a je širokospektrální. Dále je tato látka stabilní a dobře rozpustná ve vodě. Mechanismus streptomycinu je takový, že se antibiotikum naváže na ribozom bakterie a zapříčiní to, že jsou vkládány nesprávné aminokyseliny do buněčné stěny bakterie – inhibuje proteosyntézu. Streptomycin je zaměřen zejména proti gramnegativním bakteriím. Streptomycin se využívá k léčbě tuberkulózy. Mezi největší nevýhody patří velké riziko vzniku neurotoxicity a senzibilace kvůli rychlému vývoji rezistence. [25]

### 2.2.5.3 Nisin

Nisin patří mezi bakteriociny, což jsou peptidy produkované bakteriemi, které vykazují antimikrobiální vlastnosti. Tato látka je složena z 34 aminokyselin a účinkuje především proti grampozitivním bakteriím, protože gramnegativní mají odolnější buněčnou stěnu.

Produkuje jej bakteriální kmen *Lactococcus lactis subsp. lactis* a pro člověka není toxický. [26]



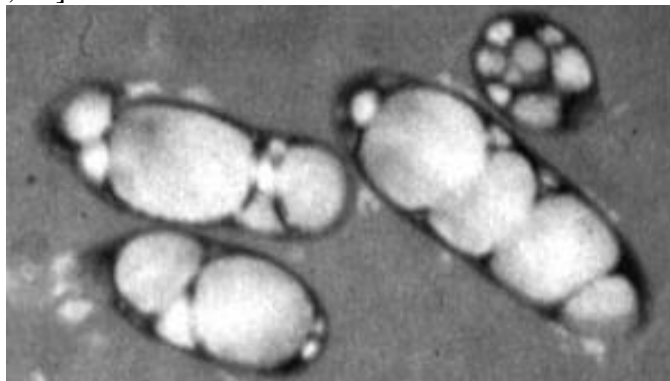
**Obrázek 8:** Chemická struktura nisinu

## 2.3 Modelový mikroorganismus

Některé bakterie jsou schopny produkce a akumulace tzv. polyhydroxyalkanoátů (PHA). Jejich funkce je ochranná (vůči různým stresům, např. teplotě, UV, aj.) a zásobní. PHA lze rozdělit do dvou skupin. První skupinu zastupují bakterie (např. *Cupriavidus necator*), jež produkují PHA jen v případě omezených zdrojů prvků pro jejich výživu při současném nadbytku uhlíku. Do druhé skupiny patří bakterie (např. *Alcaligenes latus*), které jsou schopny produkce PHA i během růstu. [27]

### 2.3.1 *Cupriavidus necator* H16

*Cupriavidus necator* H16 (dříve *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha* a *Alcaligenes eutrophus* H16) je schopna syntézy PHA z různých substrátů, například z odpadních produktů potravinářského průmyslu (odpadní oleje, syrovátka, melasa, aj.). Tento bakteriální kmen se řadí se mezi gramnegativní chemolitoautotrofní bakterie, nalézt se dá v půdě a ve sladkých vodách. *Cupriavidus necator* H16 produkuje poly(R-3-hydroxybutyrát) a akumuluje ho ve formách intracelulárních granulí. Bakterie patří mezi nejprostudovanější bakterie, které jsou schopny produkce PHA. Tato bakterie má i mutantní kmen, PHB<sup>-</sup>, který není schopen akumulace PHA. [28, 29]



**Obrázek 9:** *Cupriavidus necator* H16 (detail granulí s PHAs) [30]

## 2.4 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou přírodní lineární polyestery mastných hydroxykyselin. Prvním izolovaným polyhydroxyalkanoátem byl polyhydroxybutyrát, z bakterie *Bacillus megaterium* (1926). Od této izolace byl polyhydroxybutyrát nalezen v mnoha druzích grampozitivních i gramnegativních bakterií (známo více než 75 druhů). K tomu, aby došlo k syntéze PHA, musí být v prostředí dostatek uhlíkatého zdroje a musí dojít k limitaci některé důležité živiny. PHA pak slouží jako zásobní zdroj uhlíku, energie a redukční síly. Po vyčerpání uhlíkatého zdroje dokáží bakterie PHA rozložit pomocí intracelulárních depolymeráz na uhlík a zdroj energie a dále využít na důležité buněčné pochody. [31, 32]

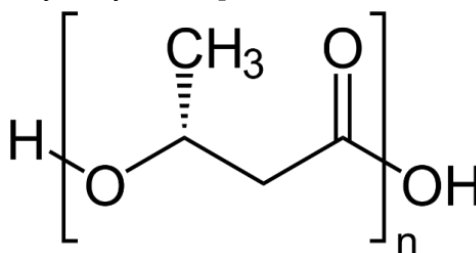
Hlavní výhodou PHA je ochrana životního prostředí, a to z důvodu, že dokáží být rychle biodegradovány za aerobních i anaerobních podmínek. Tvoří se v buňce jako samostatné částice lokalizované v cytoplazmě a bývají viditelné i elektronovým mikroskopem. Jsou produkovány např. z obnovitelných zdrojů (škrob, sacharóza, celulóza, triacylglyceroly) nebo z fosilních zdrojů (methan). Dále mohou být produkovány z vedlejších produktů potravinářského průmyslu (viz kap. 2.3.1) nebo z chemikálií (kyselina propionová, 4-hydroxymáselná). [33]

### 2.4.1 Struktura a vlastnosti

PHA se dělí do dvou skupin v závislosti na počtu atomů uhlíku v jejich monomerních jednotkách:

- Short-chain-length (SCL) – monomery z 3-5 atomů uhlíku.
- Medium-chain-length (MCL) – monomery z 6-14 atomů uhlíku. [34]

Mezi jejich vlastnosti patří to, že jsou zcela biosyntetické, biodegradovatelné a netoxické. Hydroxylová skupina se vyskytuje výhradně v R konfiguraci, za což je odpovědná specifita enzymů, které jsou zapojeny do syntézy PHA. [31, 32]



**Obrázek 10:** Obecný vzorek polyhydroxyalkanoátu

Jak už bylo řečeno výše (viz kap. 2.3.1), granule se nachází v cytoplazmě buněk, které jsou bohaté na PHA. Od cytoplazmy jsou odděleny a obsahují přibližně 98 % polyesteru, 1,5 % proteinů a 0,5 % lipidů. Proteiny, lipidy a fosfolipidy tvoří obal, na povrchu granule je lipidická vrstva, do které jsou zanořeny polymerázy, depolymerázy, phasiny a další proteiny. Lipidická vrstva odděluje hydrofobní jádro granule od hydrofilního cytoplazmatického prostoru. [35]

### 2.4.2 Využití

Polyhydroxyalkanoáty našly díky svým vlastnostem uplatnění v medicínských aplikacích, kde interagují s biologickým systémem. Důležitá je i jejich biokompatibilita určující, jak bude tkáň na tento materiál reagovat. Dále se PHAs využívají v aplikacích, které zahrnují řízené

uvolňování pesticidů nebo živin, také na gelové výsadby a ochranu rostlin. Dalším významným využitím PHAs je jejich využití jako obalových materiálů, kdy by mohl být velice užitečný například v potravinářství. Největší nevýhodou PHAs je jejich vysoká cena oproti polypropylenu, proto je nelze syntetizovat ve velkém množství. [36]

## 2.5 Metody pro stanovení citlivosti bakterií vůči bakteriocidním léčivům

Výsledky metod pro stanovení citlivosti bakterií vůči bakteriocidním léčivům mají význam při výběru konkrétní antimikrobiální látky pro léčbu. Tyto metody se řadí mezi základní vyšetření mikrobiologických laboratoří a vyvíjí se dynamicky. Testování má uplatnění nejen v klinické praxi, ale také ve výzkumné činnosti při vývoji nových antibiotik a při sledování vývoje rezistence.

Pro tyto účely jsou využívány kvalitativní a kvantitativní metody, které se liší stupněm standardizace, technickou a materiální náročností, reprodukovatelností výsledků a spolehlivostí. Kvalitativní metody dělí testované kmeny na citlivé, intermediární a rezistentní. Kvantitativní metody vyjadřují hodnotu míry citlivosti nebo rezistence daného kmenu k antibiotiku vyjádřené jako MIC nebo MBC (viz kap. 2.2.3.1). [37]

### 2.5.1 Kvalitativní metody

Tyto metody jsou založené na difúzi antimikrobiální látky ze zdroje do okolí, která zabraňuje růstu mikroorganismu.

Nejčastější metoda pro stanovení citlivosti je **difúzní diskový test** v agarovém médiu (vhodný je Mueller-Hintonův agar). Po povrchu agaru se rovnoměrně rozetře inokulum a následně jsou na roztěr aplikovány papírové disky napuštěné antibiotiky. Koncentrace antibiotika na každém disku je pro stanovení citlivosti velice důležitá.

Antibiotika z disku během kultivace difundují do okolního agaru. Projev účinné látky je tvorba kruhové, tzv. inhibiční zóny kolem disku. Z velikosti této inhibiční zóny se určuje citlivost bakterie k testované látce. Na velikost zóny má vliv schopnost antimikrobiální látky difundovat agarem a rychlost růstu dané bakterie. Pro každou bakterii a dané antibiotikum je individuální hraniční hodnota rezistence. Pomocí standardních bakteriálních kmenů je potom kontrolována správnost testu. Pokud jsou dodrženy podmínky (kvalita agaru, pH, koncentrace iontů, velikost a fyziologický stav inokula), jsou průměry inhibičních zón srovnatelné s hodnotami MIC (viz kap. 2.2.3.1).

Další metoda používaná ke kvalitativnímu stanovení citlivosti bakterií vůči antimikrobiálním látkám je **agarová difúzní metoda**, která byla použita i v této bakalářské práci. Princip tohoto testu je podobný jako u diskového difúzního testu. Rozdíl je v aplikaci antimikrobiální látky, která se pipetuje do vyhloubených jamek v agarovém médiu. [37]

### 2.5.2 Kvantitativní metody

V této bakalářské práci byla při hodnocení citlivosti bakterií vůči vybraným antibiotikům využita **bujónová diluční metoda**. Dříve se tato metoda prováděla ve zkumavkách, ale v dnešní době byla rozšířena a zpopularizována díky mikrotitračním destičkám (viz obr. 11), ve kterých se téměř výhradně provádí. Destičky obsahují 96 jamek o objemu 0,1 ml, díky čemuž je možné otestovat na jediné destičce až 12 antibiotik v 8 koncentracích. Po inkubaci při

30 °C (teplota běžné inkubace a teplotní optimum pro *Cupriavidus necator* H16) se hodnotí nárůst či pokles zákalu v dané jamce, z čehož se pak zjišťují hodnoty MIC. [37]



**Obrázek 11:** Mikrotitrační destičky

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použité bakterie, chemikálie a přístroje

##### 3.1.1 Použité bakterie

Během experimentální práce se pracovalo s bakteriálními kmeny *Cupriavidus necator* H16, který byl získán z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně, a *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup> zakoupeného z Leibnitz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Německo.

##### 3.1.2 Použité chemikálie

- Nutrient Broth (HiMedia)
- Agar Powder (HiMedia)
- Peptone (HiMedia)
- Beef extract (HiMedia)
- Propidium jodid (eBioscience)
- Nisin from *Lactococcus lactis* (Sigma-Aldrich)
- Streptomycin sulfate salt, powder, BioReagent (Sigma-Aldrich)
- Penicillin G sodium Salt (Sigma-Aldrich)

##### 3.1.3 Použité přístroje

- Průtokový cytometr, Apogee A50, Apogee Flow Systems
- Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments
- Temperovaná třepačka, Heidolph Unimax 1010, Labicom s.r.o.
- Temperovaná třepačka, Orbital shaker-Incubator ES-20, Biosan
- Předvážky, Kern EW 620-3NM
- Analytické váhy, Boeco
- Termostat, LS-35
- Centrifuga, Boeco U-32R
- ELISA reader – Elx808, BioTek Instruments, Inc.
- Inkubátor, IP60
- Spektrofotometr, Biotech Implen
- Vortex, TK3S, Tecno Kartell
- Multipipeta
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

#### 3.2 Kultivace bakterií

Pro přípravu inokula pro kmeny *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup> byl použit Nutrient Broth o složení:

- Beef extract 10 g
- Pepton 10 g
- NaCl 5 g
- Agar 20 g

Minerální (produkční) médium pro kultivaci bakterií mělo následující složení:

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,02 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  11,1 g
- $\text{MgSO}_4$  0,2 g
- Fruktóza 20 g
- Roztok stopových prvků\* 1 ml
- Destilovaná voda 1 000 ml

\*Roztok stopových prvků:

- $\text{FeCl}_3$  9,7 g
- $\text{CaCl}_2$  7,8 g
- $\text{CuSO}_4$  0,156 g
- $\text{CoCl}_2$  0,119 g
- $\text{NiCl}_2$  0,118 g
- $\text{CrCl}_2$  0,062 g
- $\text{HCl}$  (0,1 M) 1 000 ml

### 3.2.1 Příprava inokula

Inokulum bylo pro kultivaci připravované ve 100 ml Erlenmayerových baňkách s 50 ml živného média Nutrient Broth (25 g/l). Následně bylo vysterilizováno v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem po dobu 60 minut. Po sterilizaci a ochlazení na laboratorní teplotu byla inokula přeočkována bakteriologickou kličkou z agarové misky v laminárním boxu. Poté bylo inokulum kultivováno 24 hodin na temperované třepačce nastavené na teplotu 30 °C při 170 rpm. Všechna inokula byla připravována ve dvou paralelních pokusech.

### 3.2.2 Příprava minerálního média

Inokulum bylo po kultivaci přeočkováno do tekutého minerálního (produkčního) média. Minerální médium bylo připraveno ze solí (viz složení minerálního média) a smícháno s destilovanou vodou o objemu 100 ml. Připravené roztoky byly sterilizovány v tlakovém hrnci po dobu 60 minut. Po sterilizaci a vychlazení roztoků bylo v laminárním boxu přidáváno do minerálního média 5 ml fruktózy (20 g/l), 100 µl roztoku stopových prvků a 5 ml připraveného inokula. Následovala kultivace, která trvala 72 hodin, při 30 °C na temperované třepačce při 170 rpm.

### 3.2.3 Příprava agarových misek

Agarové misky byly připraveny pro plotnovou metodu a agarový difúzní test. Agar Powder (20 g/l) byl smíchán s Nutrient Brothem a destilovanou vodou. Po 60 minutách sterilizace v tlakovém hrnci byla směs rozlita na plastové Petriho misky v laminárním boxu a po zaschnutí agaru byly misky použity k další práci.

## 3.3 Příprava antibiotik

Antibiotika byla připravována tak, aby vzniklé roztoky měly následující koncentrace [mg/ml]:

Nisin	0,01	0,25	0,5
Streptomycin	0,0001	0,01	0,5
Penicilin	0,0001	0,01	0,5

Příprava jednotlivých antimikrobiálních látek byla opakována, protože pro první pokus byla zvolena příliš nízká koncentrace antibiotika 0,1 mg/ml, při které antibiotika na bakterie nepůsobila. Proto v následujícím pokuse byla koncentrace zvýšena na 1 mg/ml.

Roztok nisinu byl připraven rozpuštěním 10 mg nisinu v 10 ml PBS\* (Phosphate Buffered Saline = pufovaný fyziologický roztok), po přidání dalších 10 ml PBS vznikl požadovaný roztok nisinu o koncentraci 0,5 mg/ml. Z této koncentrace o objemu 20 ml byla polovina pipetována do jiné plastové nádoby a k ní opět přidáno 10 ml PBS, čímž vznikl roztok o koncentraci 0,25 mg/ml. Pro přípravu roztoku nisinu s koncentrací 0,001 mg/ml byl z roztoku (0,25 mg/ml) odpipetován 1 ml, ke kterému se přidalo 24 ml PBS.

Roztoky streptomycinu a penicilinu byly připraveny stejným postupem, protože požadované koncentrace byly stejné. Hmotnost 15 mg antibiotika byla rozpuštěna v 15 ml PBS. K tomuto objemu bylo přidáno dalších 15 ml PBS, díky čemu vznikl roztok o koncentraci 0,5 mg/ml. Pro vznik roztoku antibiotika s koncentrací 0,01 mg/ml bylo z roztoku (0,5 mg/ml) odpipetováno 0,5 ml, ke kterému se přidalo 24,5 ml PBS. Z tohoto roztoku se nakonec vzal 1 ml a přidáním 9 ml PBS vznikl požadovaný roztok antibiotika s koncentrací 0,0001 mg/ml.

\*Složení PBS:

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,144 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
Destilovaná voda	1 000 ml

### 3.4 Použité metody

#### 3.4.1 Stanovení viability plotnovou metodou

Produkční média obou kmenů bakterie *Cupriavidus necator* byla napipetována po 5 ml do centrifugačních zkumavek. Následovala centrifugace při 5000 ot. po dobu 5 minut. V laminárním boxu byly odlity supernatanty, a ke každému sedimentu bylo napipetováno 5 ml daného antibiotika s určitou koncentrací. Jedna centrifugační zkumavka sloužila jako kontrola, tudíž k sedimentu nebylo přidáno antibiotikum, ale PBS.

Poté proběhla inkubace na rotační třepačce po dobu 2 hodin (při prvním pokusu inkubace trvala pouhých 20 minut, ale byla prodloužena kvůli metabolismu bakterií, které jsou metabolicky aktivní až po hodině). Po inkubaci byly vzorky naředěny desítkovým ředěním do ředění 10<sup>7</sup> (pouze kontrola až do 10<sup>8</sup>). Poté bylo sterilní hokejkou rozetřeno 0,1 ml od ředění 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup> a 10<sup>7</sup> na agarové plotny (Agar Powder – 20 g/l, Nutrient Broth – 25 g/l). Každé ředění bylo rozetřeno na tři agarové plotny. Tyto plotny byly kultivovány 72 hodin při 30 °C (teplotní optimum pro *Cupriavidus necator*) a následně byl na miskách stanoven počet přeživších (20-200).

#### 3.4.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (flow cytometry) patří mezi analytické metody, kdy lze během krátkého časového úseku analyzovat velké množství buněk (až 100 000 buněk za sekundu). Díky tomu je možné studovat buněčné populace (platí pro prokaryotické i eukaryotické buňky).



Průtoková cytometrie je založena na analýze na úrovni jedné buňky. Výhodou je možnost multiparametrické analýzy, tzn. že v rámci jedné analýzy lze sledovat řadu různých parametrů. Tyto parametry se dávají dohromady při vyhodnocování. [38, 39]

Přístroj, jako takový, je integrovaný systém, který využívá principů optické mikroskopie a citlivé detekce světelného signálu. Je rozdělena na tři části (fluidní, optický a elektronický systém). [39]

#### **3.4.2.1 Stanovení viability průtokovou cytometrií**

Pro stanovení viability buněk je nutné nastavit přístroj tak, aby v histogramu byly rozlišeny populace živých buněk od mrtvých. To závisí na nastavení napětí fotonásobičů, na které dopadají fotony excitovaného záření. Jejich nastavením lze ovlivnit intenzitu signálu tak, aby bylo možné rozlišit signál buněk obarvených od těch neobarvených.

Jako fluorescenční sonda bylo použito fluorescenční barvivo propidium jodid. Živé buňky, které mají neporušené membrány jsou schopny barvivo exkludovat. Naopak propidium jodid snadno napadá buňky mrtvé nebo poškozené, kde se interkaluje do DNA, z čehož vyplývá, že mrtvé buňky fluoreskují.

Z desítkového ředění (viz kap. 3.4.1) bylo použito pro stanovení viability ředění  $10^2$  na 1 ml. Bylo přidáno 5  $\mu$ l propidium jodidu o koncentraci 1 mg/ml a stanovila se viabilita bakterií.

#### **3.4.3 Agarová difúzní metoda**

Tato metoda je jednoduchá, praktická a ze všech metod nejméně finančně náročná. Na agarovou půdu na Petriho misce byl nanesen bakteriální kmen (H16 a PHB<sup>-4</sup>) a po oschnutí (20 minut) byly do agaru vyhloubeny jamky, do kterých bylo pipetováno 50  $\mu$ l daných antibiotik. Po inkubaci při 30 °C po dobu 24 hodin byly odečteny výsledky. To bylo provedeno změřením průměrů inhibičních zón. Tento průměr je tím větší, čím je testovaný kmen citlivější. Výsledky agarové difúzní metody jsou kvalitativní, tzn. že určují, pokud je kmen citlivý nebo rezistentní.

#### **3.4.4 Bujónová diluční metoda**

Před samotným pokusem bylo nutné zařídit, aby absorbance buněčné suspenze pro oba kmeny byla velmi blízká hodnotě 0,1 při 630 nm. To bylo zrealizováno přidáním Nutrient Brothu (NB), který byl smíchán s destilovanou vodou a následně sterilizován, k bakteriálním mediím. Požadované absorbance se dosáhlo smícháním 50  $\mu$ l kmenu PHB<sup>-4</sup> s 10 ml NB a 500  $\mu$ l H16 s 9,5 ml NB.

V laminárním boxu byly pipetovány dané objemy roztoků do mikrotitrační destičky. Ve všech jamkách byl stejný objem roztoků – 150  $\mu$ l. První 3 jamky obsahovaly pouze blank (destilovanou vodu), další jamky čisté buněčné suspenze obou kmenů bez přidání antibiotik pro kontrolu. V ostatních jamkách byla antibiotika s buněčnými suspenzemi pipetována tak, aby konečné zředění těchto jamek bylo stejné, jako při přípravě antibiotik (viz kap. 3.3).

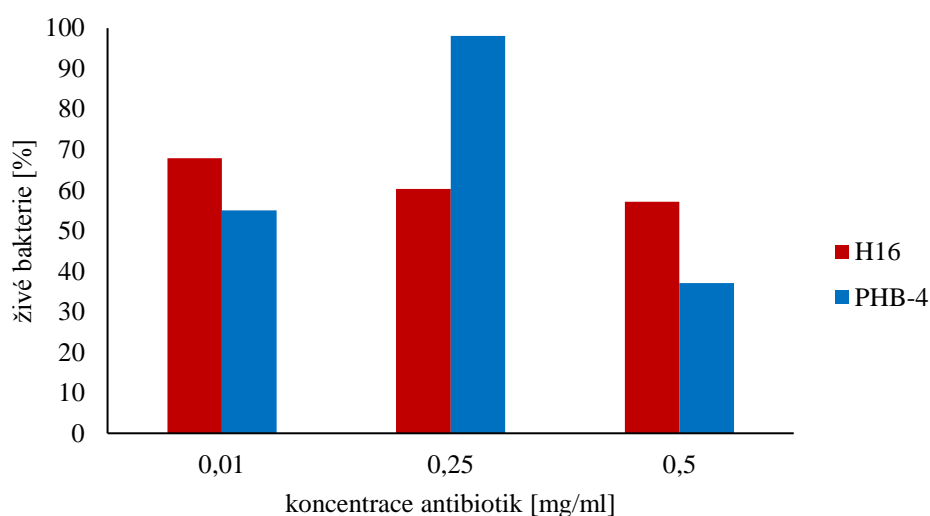
Takto připravené destičky (pro kmeny H16 a PHB<sup>-4</sup>) byly proměřeny na ELISA readeru, který vyhodnotil absorbanci v jednotlivých jamkách. Měření proběhlo po 0, 4, 8, 12 a 24 hodinách a následně byl vyhodnocen účinek antibiotik na bakterie.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

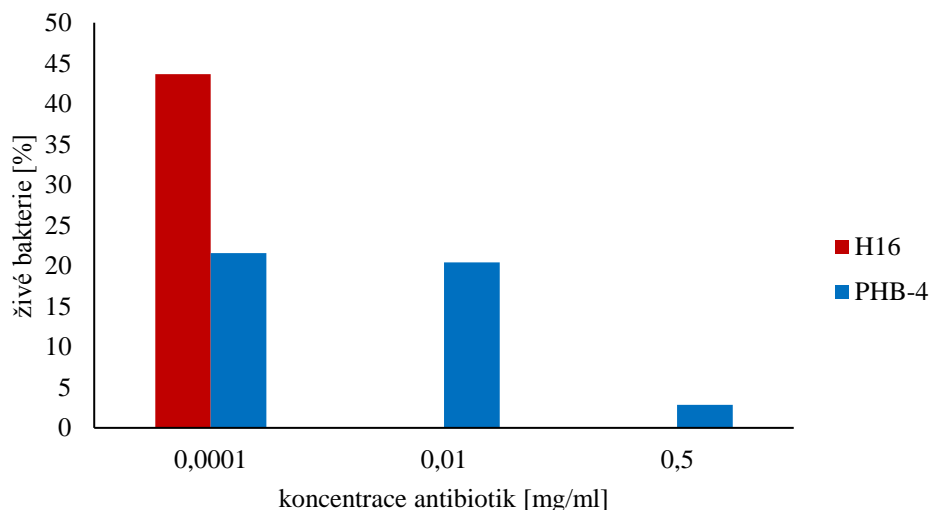
### 4.1 Stanovení viability plotnovou metodou

V prvním experimentu byla posouzena citlivost obou modelových bakterií (PHA produkujícího kmene *C. necator* H16 a jeho PHA negativního mutantu *C. necator* PHB<sup>-4</sup>) vůči vybraným antibiotikům pomocí počítání kolonií na agarových plotnách. Testovaná antibiotika byla dávkována v koncentracích: nisin – 0,01 mg/ml, 0,25 mg/ml a 0,5 mg/ml a streptomycin a penicilin – 0,0001 mg/ml, 0,01 mg/ml a 0,5 mg/ml.

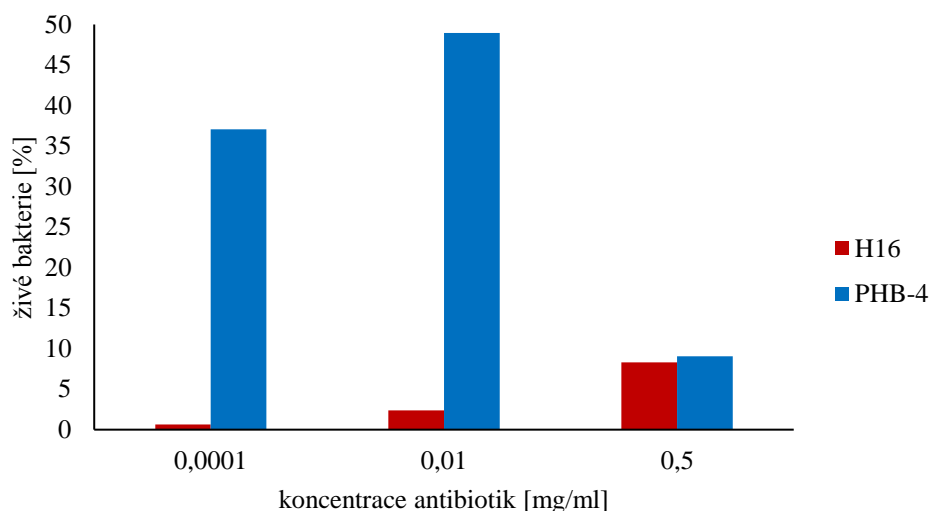
Po 72 hodin byl porovnán počet množení schopných buněk v každém vzorku s kontrolním vzorkem, který nebyl vystaven působení antibiotik.



**Obrázek 12:** Procentuální zastoupení živých bakterií kmenů H16 a PHB<sup>-4</sup> vystavených NISINU



**Obrázek 13:** Procentuální zastoupení živých bakterií kmenů H16 a PHB<sup>-4</sup> vystavených STREPTOMYCINU



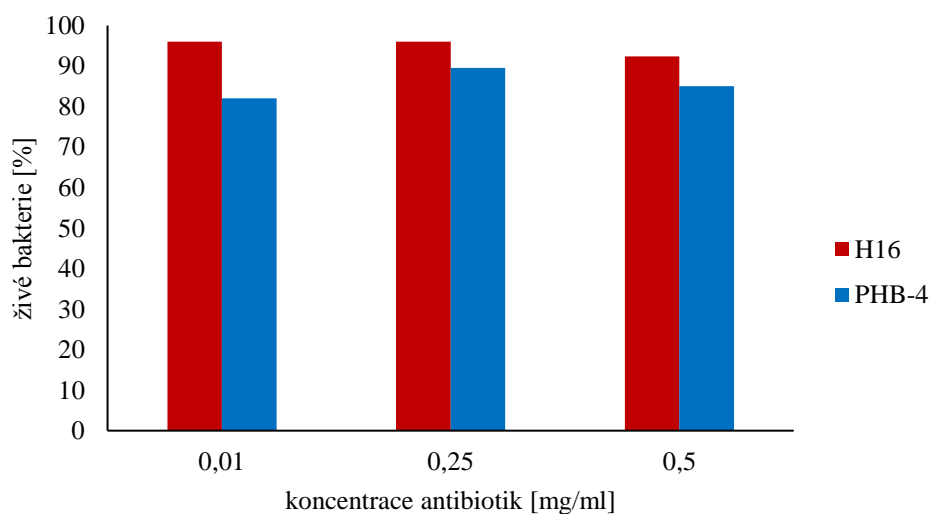
**Obrázek 14:** Procentuální zastoupení živých bakterií kmenů H16 a PHB<sup>-4</sup> vystavených PENICILINU

Z výsledků lze usoudit, že nejmenší účinnost mělo použití nisinu, zatímco u streptomycinu a penicilinu přežilo mnohem menší procento bakterií u všech koncentrací antibiotik. Kmen H16 byl až na nisin (0,01 mg/ml a 0,5 mg/ml) a streptomycin (0,0001 mg/ml) vůči použitým antibiotikům mnohem citlivější než kmen PHB<sup>-4</sup>. V příloze 1 můžeme porovnat vliv streptomycinu (0,5 mg/ml) na bakterie, kdy u kmenu H16 přežilo méně než 1 % bakterií, zatímco u PHB<sup>-4</sup> odolaly antibiotiku 3 % bakterií.

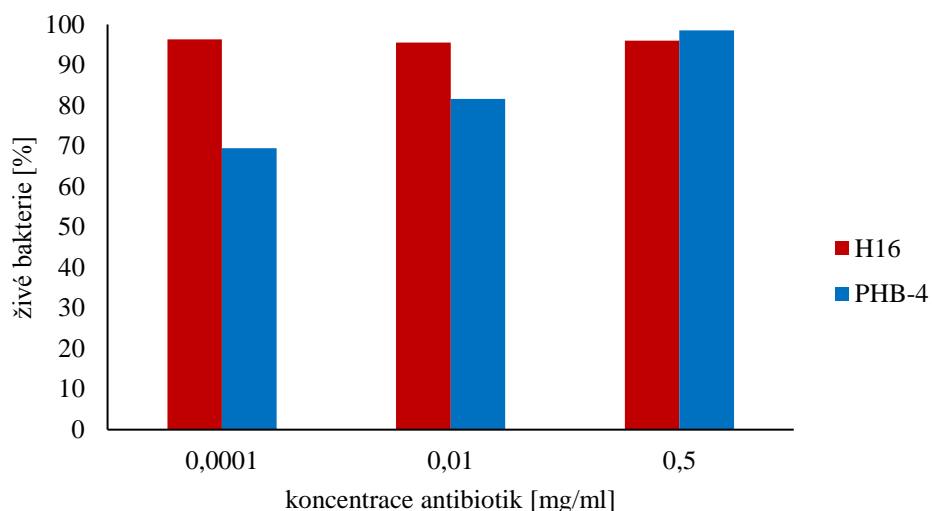
Antibiotika poškodila buněčnou stěnu, čímž zabránila dělení a bakterie postupně odumíraly.

#### 4.2 Stanovení viability průtokovou cytometrií

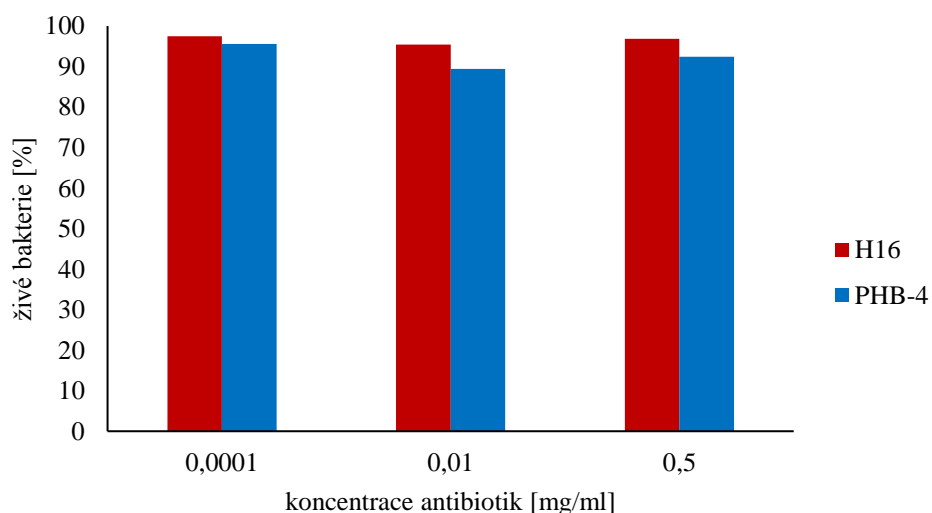
Průtoková cytometrie je metoda založena na analýze jedné buňky. Propidium jodid (fluoresceční sonda) interkaloval do DNA mrtvých nebo poškozených buněk, které po analýze fluoreskovaly.



**Obrázek 15:** Procentuální zastoupení živých bakterií kmenů H16 a PHB<sup>-4</sup> vystavených NISINU



**Obrázek 16:** Procentuální zastoupení živých bakterií kmenů H16 a PHB<sup>-4</sup> vystavených STREPTOMYCINU



**Obrázek 17:** Procentuální zastoupení živých bakterií kmenů H16 a PHB<sup>-4</sup> vystavených PENICILINU

V porovnání s plotnovou metodou byla u průtokové cytometrie úmrtnost bakterií minimální (kmen H16 byl až na streptomycin o koncentraci 0,5 mg/ml odolnější vůči působení antimikrobiálních látek než mutantní kmen PHB<sup>-4</sup>). Pravděpodobně je to z důvodu, že použítá antibiotika působila bakteriostaticky (viz kap. 2.2.3.1) na oba kmeny. Z toho důvodu se na cytometru bakterie jeví jako živé, protože nemají poškozenou buněčnou stěnu, ale mají zastavený metabolismus, tzn. že se nemohou dál dělit. Je velice pravděpodobné, že ve vzorcích byly buňky, které byly živé podle průtokové cytometrie, ale už se nebyly schopny dělit.

V příloze 2 je vidět porovnání histogramů z oranžového kanálu pro streptomycin o koncentraci 0,5 mg/ml, kdy počet živých buněk je nižší pro kmen H16 než pro PHB<sup>-4</sup>.

### 4.3 Agarová difúzní metoda

Na misky s agarem byla naočkována bakteriální suspenze a následně byla do vyhloubených jamek v agaru pipetována antibiotika. Pokud mikrob roste až k jamce, nebo má jen malou zónu, je rezistentní. Naopak pokud je kolem jamky velká zóna citlivosti (až neměřitelná), bakterie je vůči danému antibiotiku citlivá.

Tato metoda byla provedena dvakrát, kdy byly aplikovány nezředěné roztoky antibiotik, ale účinnost nebyla optimální. Proto se roztoky antibiotik zředily desítkovým ředěním a bylo aplikováno ředění  $10^2$ .

**Tabulka 1:** Průměry inhibičních zón pro kmen H16

Penicilin [mg/ml]	0,0001	0,01	0,5
	x	x	1,3 cm
Streptomycin [mg/ml]	0,0001	0,01	0,5
	0,2 cm	0,2 cm	1,5 cm
Nisin [mg/ml]	0,01	0,25	0,5
	x	0,3 cm	0,4 cm

**Tabulka 2:** Průměry inhibičních zón pro kmen PHB<sup>-4</sup>

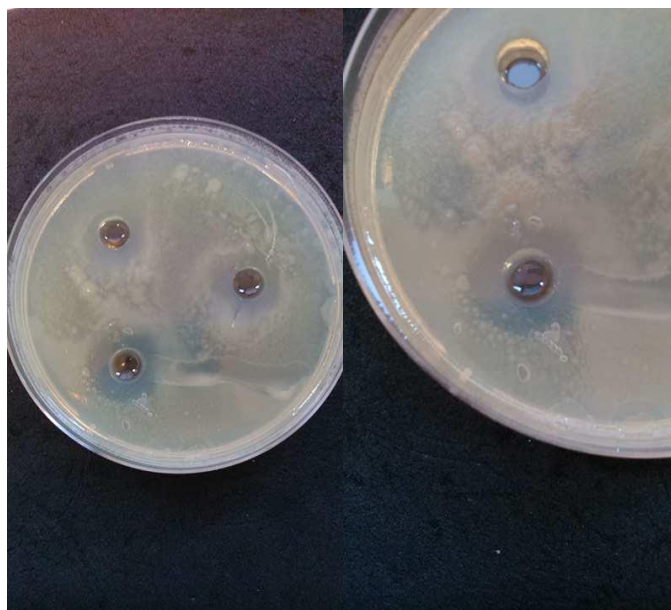
Penicilin [mg/ml]	0,0001	0,01	0,5
	x	x	1,1 cm
Streptomycin [mg/ml]	0,0001	0,01	0,5
	x	x	0,8 cm
Nisin [mg/ml]	0,01	0,25	0,5
	x	x	x

Z výsledků je vidět, že největší inhibiční zóny se vytvořily působením streptomycinu (0,5 mg/ml) a penicilinu (0,5 mg/ml), které mají na oba kmeny bakterií největší vliv (porovnání pro penicilin viz přílohy 3 a 4). Čím je průměr větší, tím je testovaný kmen citlivější.

Výsledky této metody potvrzují plotnovou metodu, kdy byl také kmen H16 vůči použitým antibiotikům citlivější než kmen PHB<sup>-4</sup>. Zde to potvrzují velikosti inhibičních zón – viz obr. 18 a 19.



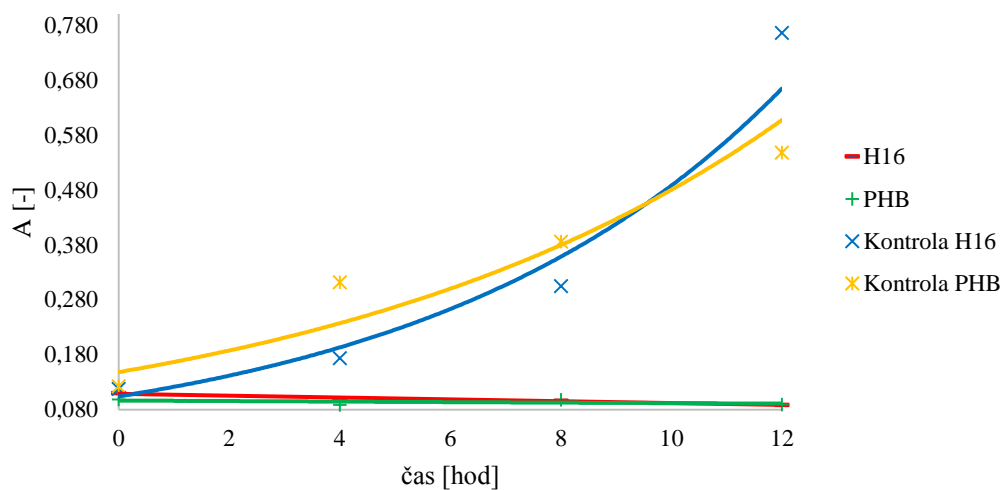
**Obrázek 18:** Streptomycin 1 mg/ml (H16)



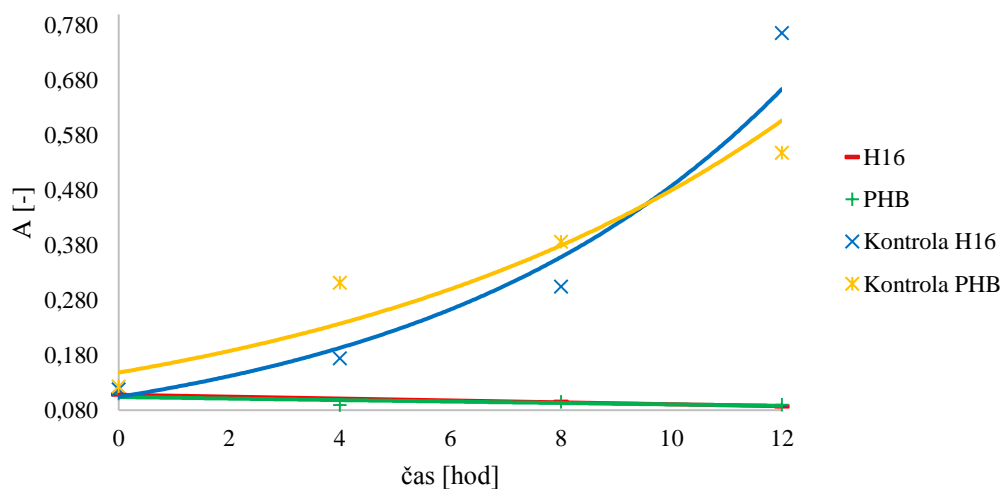
**Obrázek 19:** Streptomycin 1 mg/ml (PHB<sup>-4</sup>)

#### 4.4 Bujónová diluční metoda

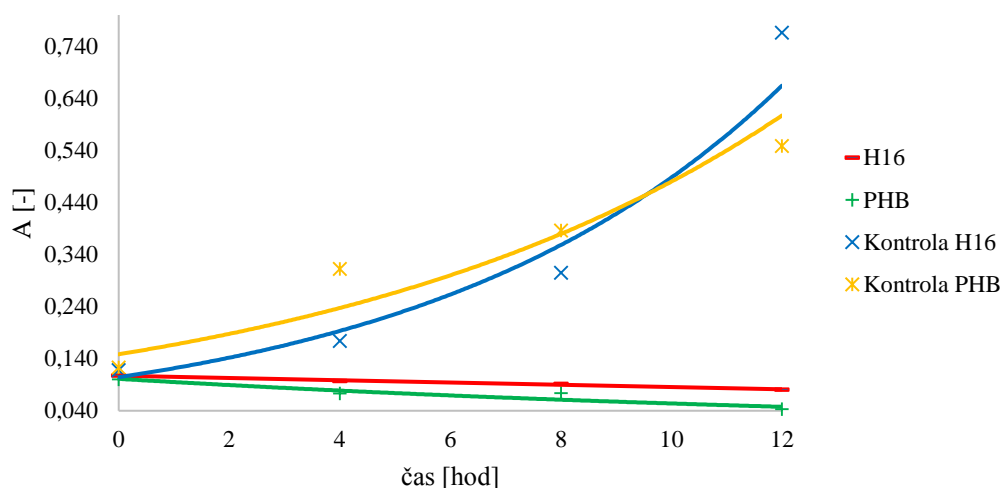
Bujónová diluční metoda se provádí v mikrotitračních destičkách s 96 jamkami, kdy se do jednotlivých jamek v destičce pipetovalo 50  $\mu$ l daného antibiotika a 150  $\mu$ l buněčné suspenze *C. necator* kmenů H16 a PHB<sup>-4</sup>.



**Obrázek 20:** Změna absorpance v čase u nisinu (0,01 mg/ml)

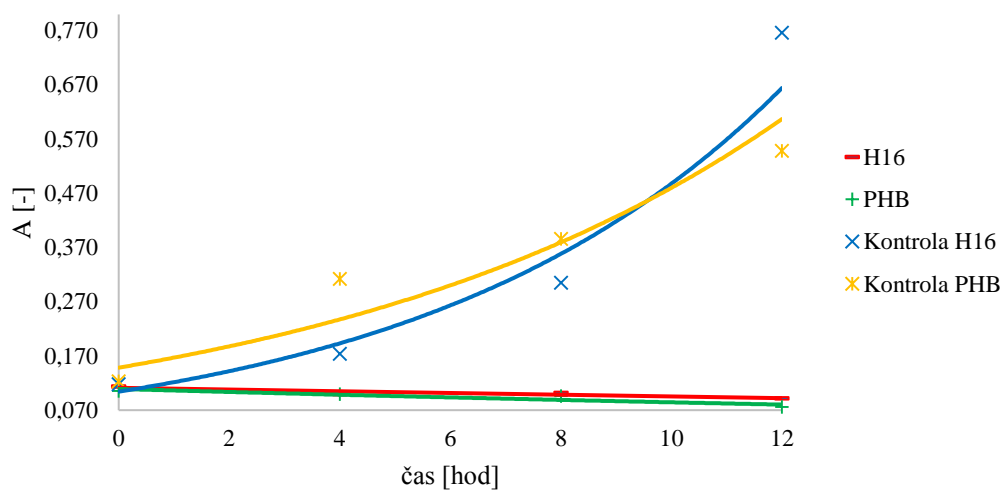


**Obrázek 21:** Změna absorpance v čase u nisinu (0,25 mg/ml)

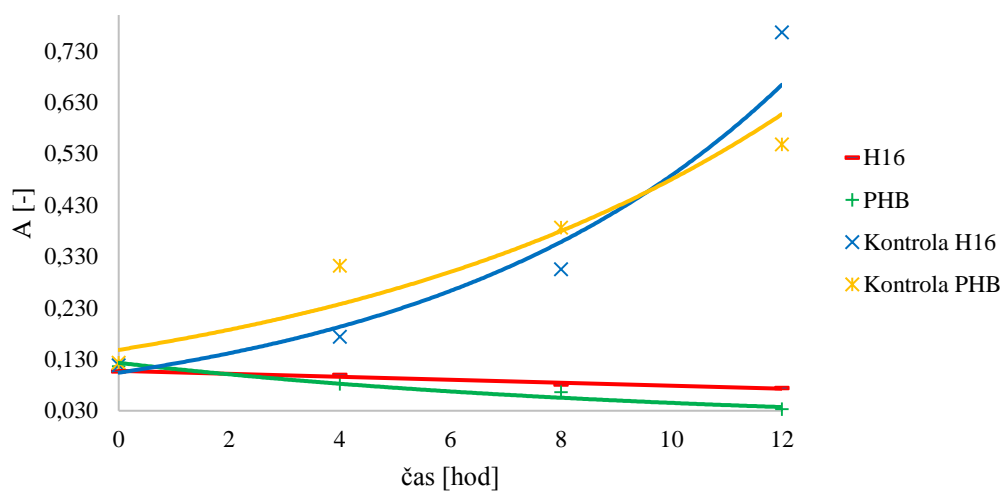


**Obrázek 22:** Změna absorpance v čase u nisinu (0,5 mg/ml)

Grafy (obr. 17 – 19) ukazují nárůst absorpance (exponenciální) pro buněčné suspenze *C. necator* H16 a PHB<sup>-4</sup> v čase. Buněčné suspenze byly bez přidaných antibiotik, tudíž jsou v pokusu brány jako kontrolní vzorky. Naopak u bakteriálních suspenzí, ke kterým byl přidán nisin, absorpance s časem mírně klesá. U nisinu o koncentracích 0,01 mg/ml a 0,25 mg/ml není rozdíl mezi poklesem u kmenů, a samotný pokles není velký, zatímco u nisinu o koncentraci 0,5 mg/ml je z grafu evidentní, že výraznější pokles absorpance nastal u kmenu PHB<sup>-4</sup>, tudíž vliv vybraného antibiotika byl větší na mutantní kmen, neschopný akumulace PHA. Obecně je možné konstatovat, že nisin působil ve všech testovaných koncentracích inhibičně vůči oběma testovaným kmenům.

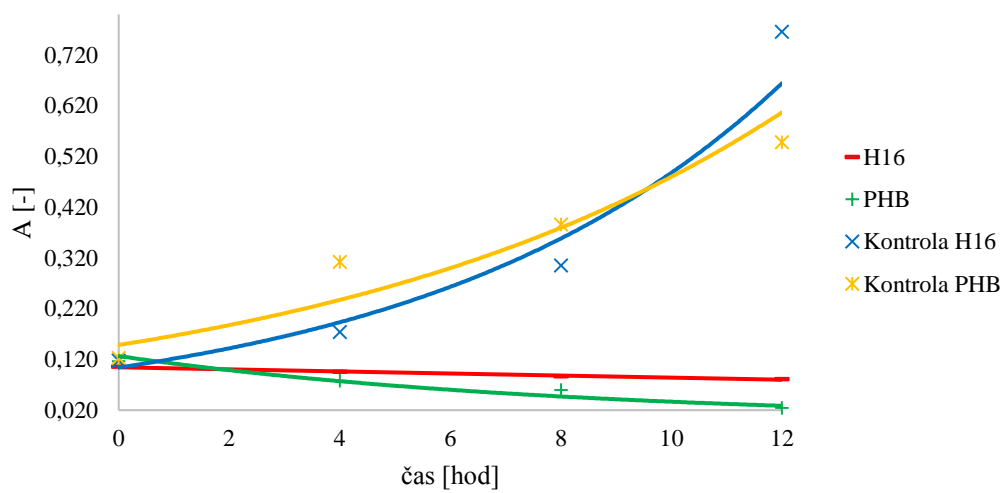


**Obrázek 23:** Změna absorbance v čase u streptomycinu (0,0001 mg/ml)

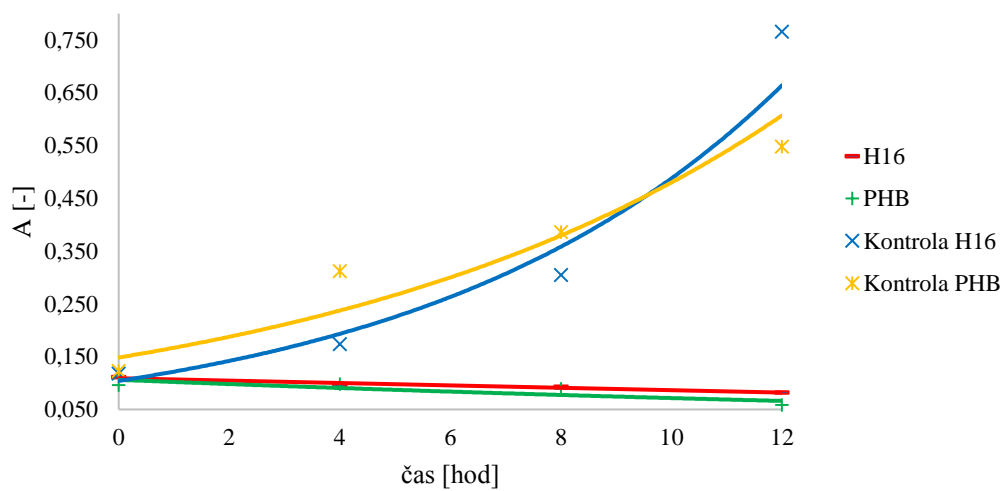


**Obrázek 24:** Změna absorbance v čase u streptomycinu (0,01 mg/ml)

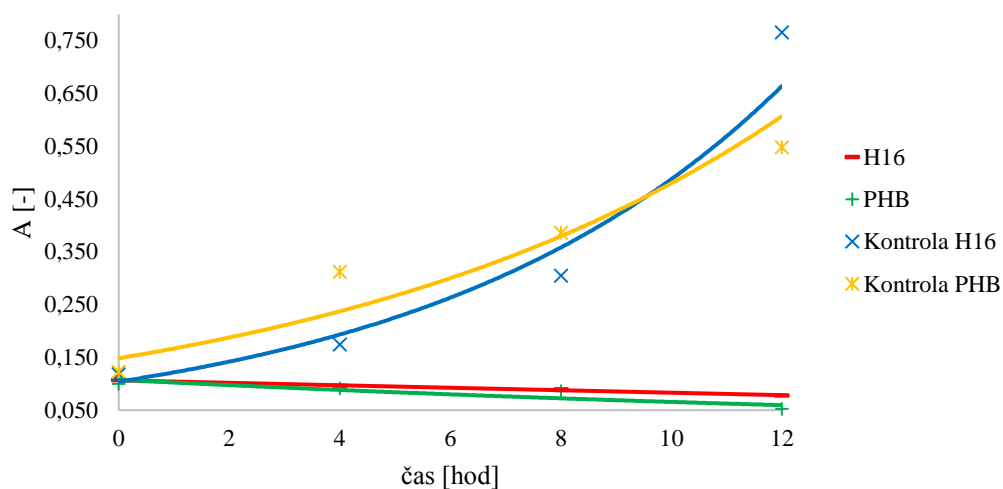




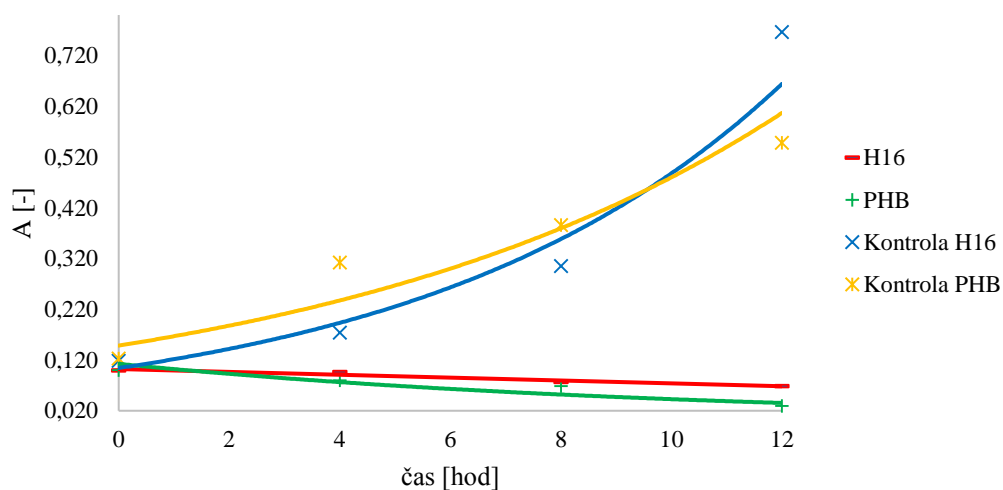
**Obrázek 25:** Změna absorbance v čase u streptomycinu (0,5 mg/ml)



**Obrázek 26:** Změna absorbance v čase u penicilinu (0,0001 mg/ml)



**Obrázek 27:** Změna absorbance v čase u penicilinu (0,01 mg/ml)



**Obrázek 28:** Změna absorbance v čase u penicilinu (0,5 mg/ml)

Obrázky 20 – 25 zobrazují vliv streptomycinu a penicilinu. Kontrolní vzorky jsou stejné jako u nisinu, ale poklesy absorbancí jsou výraznější. Obecně lze říci, stejně jako u nisinu, že všechny koncentrace streptomycinu a penicilinu působí silně inhibičně vůči testovaným kulturám *C. necator* H16 a PHB<sup>-4</sup>.

**Tabulka 3:** Změna absorbance v čase vůči 100% kontrole (čistá buněčná suspenze) pro kmen H16

		čas [hod]			
	koncentrace [mg/ml]	4	8	12	24
Nisin	0,01	-	--	---	---
	0,25	-	--	---	---
	1	-	--	---	---

		čas [hod]			
	koncentrace [mg/ml]	4	8	12	24
<b>Streptomycin</b>	0,0001	-	--	---	---
	0,01	-	--	---	---
	1	-	--	---	---
<b>Penicilin</b>	0,0001	-	--	---	---
	0,01	-	--	---	---
	1	-	--	---	---

- pokles o 50 %
- pokles o 70 %
- pokles o 90 %

**Tabulka 4:** Změna absorbance v čase vůči 100% kontrole (čistá buněčná suspenze) pro kmen PHB<sup>-4</sup>

		čas [hod]			
	koncentrace [mg/ml]	4	8	12	24
<b>Nisin</b>	0,01	-	-	-	-
	0,25	-	-	-	-
	1	-	-	--	--
<b>Streptomycin</b>	0,0001	-	-	--	--
	0,01	-	-	--	--
	1	-	-	---	--
<b>Penicilin</b>	0,0001	-	-	--	--
	0,01	-	-	--	--
	1	-	-	---	--

- pokles o 80 %
- pokles o 90 %
- pokles o 95 %

Po 4, 8, 12 a 24 hodinách inkubace byl hodnocen pokles absorbance v jamkách. Koncentrace látky inhibující růst bakterie odpovídá jamce, ve které dojde k 95%-nímu potlačení růstu bakterie. Růst se projevuje okem pozorovatelným zákalem v jamce; dojde-li k inhibici růstu, je jamka čirá.

Z tabulek 7 a 8 je zřejmý procentuální pokles absorbance vztažený ke kontrolám (100%). Antimikrobiální látky zapůsobily v tomto testu více na mutantní kmen PHB<sup>-4</sup>. Konkrétně 50% streptomycin a 50% penicilin snížily absorbanci o více než 95 %, z čehož vyplývá, že *C. necator* PHB<sup>-4</sup> je citlivý na tyto antimikrobiální látky o tomto zředění. Toto zjištění je potvrzeno i předchozí metodou, agarovou difúzní, kdy byly difúzní zóny kolem jednotlivých jamek napuštěných těmito antibiotiky největší.

## 5 ZÁVĚR

- Cílem práce bylo stanovit odolnost bakterií vůči působení vybraných antibiotik.
- Pro experimentální práci byly využity bakteriální kmen *Cupriavidus necator* H16, který je schopný tvořit polyhydroxyalkanoáty (PHA) ve formě granulí, a kmen *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup>, který PHA neprodukuje. Teplotní optimum kultivace těchto bakteriálních kmenů je 30 °C. Důležitý je také zdroj živin, *C. necator* H16 využívá jako zdroj uhlíku fruktosu.
- V prvním experimentu byla posouzena citlivost obou kmenů bakterií pomocí počítání kolonií na agarových plotnách a pomocí průtokové cytometrie. Výsledky obou metod stanovení viability byly rozdílné. Bylo to způsobeno tím, že použitá antibiotika (nisin, streptomycin a penicilin) působila bakteriostaticky (zastavují růst a množení bakterií). U plotnové metody se oproti očekávání jako výrazně senzitivnější, především vůči streptomycinu a penicilinu, ukázal být kmen akumulující PHA. Výsledky z průtokové cytometrie ukazovaly počet přeživších oproti plotnové metodě mnohem větší. Lze to vysvětlit tím, že bakterie na cytometru přežívají, ale už se nemohou dělit, zatímco na plotnách nevyrostou vůbec.
- V druhém experimentu byl použit agarový difúzní test, kdy byly měřeny inhibiční zóny, které se vytvořily kolem vyhloubených jamek. Největší účinnost mělo použití streptomycinu a penicilinu. I v tomto případě se jako senzitivnější kmen ukázala být PHA akumulující varianta *C. necator* H16.
- V posledním experimentu se zjišťovala závislost absorbance na čase, kdy s rostoucím časem klesala absorbance v jamkách v mikrotitrační destičce, z čehož se dalo usoudit, že antimikrobiální látky působí na bakterie. Všechna testovaná antibiotika vykazovala v rámci tohoto experimentu absolutní inhibiční efekt vůči oběma testovaným kmenům a to ve všech použitých koncentracích.

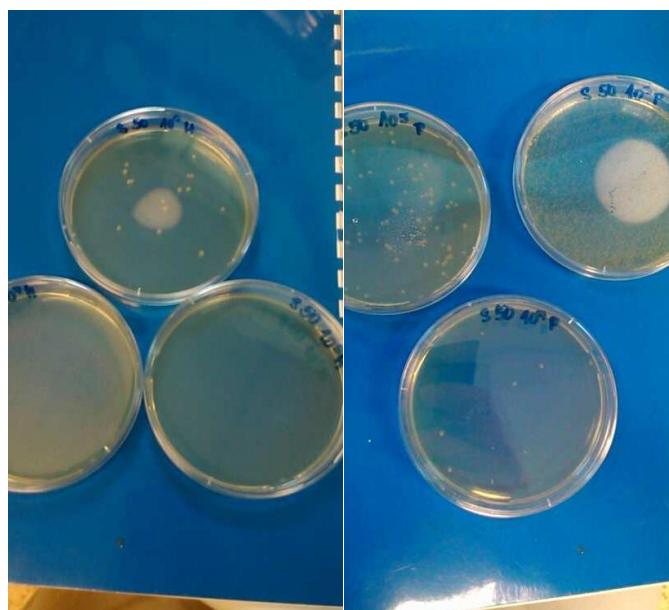
## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] HRSTKA, M. Obecná biologie. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2007, s. 29-31. ISBN 978-80-214-3464-6.
- [2] KLABAN, V. Ilustrovaný mikrobiologický slovník. 1. vyd. Praha : Galén, 2005. 654 s. ISBN 80-7262-341-9.
- [3] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ J. Encyklopedie hydrobiologie [online]. 2007 [cit. 2017-12-19]. Dostupné z: <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit1/prostruct/u1fig3.html>
- [4] JELÍNEK, J. a V. ZICHÁČEK. Biologie pro gymnázia. 3. dopl. a opr. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 1998, s. 19-20. ISBN 80-7182-070-9.
- [5] Prokaryotické organismy: říše archebakterií Archaeobacteria říše eubakterií Eubacteria s podříší bakterie Bacteria [online], [cit. 2018-02-20]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/11614922-Prokaryoticke-organismy-rise-archebakterii-archaeobacteria-risi-eubakterii-eubacteria-s-podrisi-bakterie-bacteria-sinice-cyanobacteria.html>
- [6] ŠILHÁNKOVÁ, L. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 3. upr. vyd. Praha : Academia nakladatelství Akademie věd České republiky, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6
- [7] ROSYPAL, S. Obecná bakteriologie. 1. vyd. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, 1981. 749 s.
- [8] STORZ, G. A R. HENGGE. Bacterial stress responses. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press, c2011, xv, 506 p. ISBN 15-558-1621-5.
- [9] BARRIA, C., M. MALECKI a C. M. ARRAIANO. Bacterial adaptation to cold. Microbiology [online]. 2013, 159(Pt\_12), 2437-2443. DOI: 10.1099/mic.0.052209-0. ISSN 1350-0872.
- [10] RON, Eliora Z., Bacterial Stress Response. The Prokaryotes [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, s. 589. DOI: 10.1007/978-3-642-30141-4\_79. ISBN 978-3-642-30140-7.
- [11] CSONKA, LASZLO N., Physiological and Genetic Responses of Bacteria to Osmotic Stress. Microbiological reviews. 1989, 53(1), 121-144.
- [12] LUSHCHAK, V. I. Oxidative Stress and Mechanisms of Protection Against It in Bacteria. Biochemistry (Moscow). vol. 66, issue 5, s. 476-489. DOI: 10.1023/A:1010294415625.
- [13] CHANDRA, R. Biodegradable polymers. Progress in Polymer Science. vol. 23, issue 7, s. 1273-1335. DOI: 10.1016/S0079-6700(97)00039-7.
- [14] SIMON, Claus a Wolfgang STILLE, 1998. Antibiotika v současné lékařské praxi. Havlíčkův Brod: Grada Publishing, spol. ISBN 80-7169-268-9.
- [15] VOTAVA, M.: Lékařská mikrobiologie obecná, 2005. Druhé přepracované vydání. Brno: Nakladatelství Neptun, 351s., ISBN: 80-86850-00-5.
- [16] SIKYTA, B. a J. DUŠEK, 1992. Biotechnologie pro farmaceuty. Praha: Karolinum. ISBN 80-7066-642-0.
- [17] SCHWALBE R., L. STEELE-MOORE, A. C. GOODWIN. Antimicrobial susceptibility testing protocols. Boca Raton: CRC Press, 2007. ISBN 14-200-1449-8.
- [18] KOLÁŘ, M. 2007. Vývoj bakteriální rezistence a nová antimikrobní léčiva. Interní Med. 5:213-216.

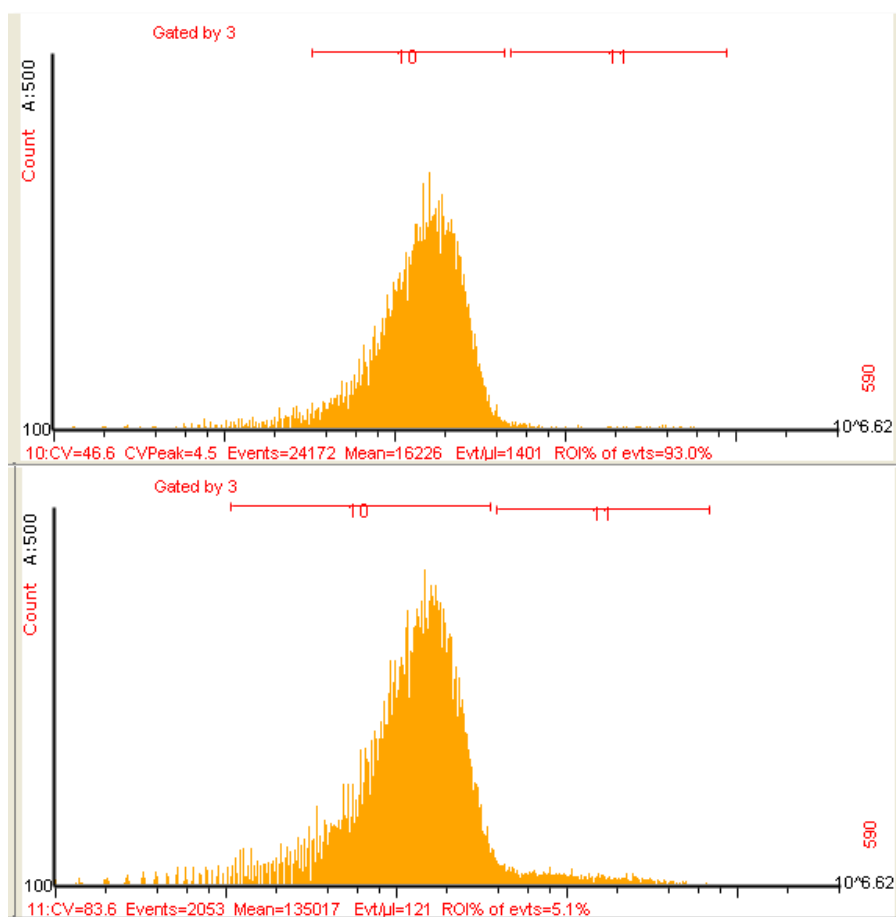
- [19] KOLÁŘ, M., K. URBÁNEK, V. HANULÍK a V. VOJTOVÁ, 2010. Vliv antibiotické léčby na vývoj bakteriální rezistence. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2010(24(4)), 181-183.
- [20] LÜLLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M.: *Farmakologie a toxikologie*. 2. české vydání, 2004. Praha: Grada Publishing a.s., 725s., ISBN: 80 – 247 – 0836 - 1.
- [21] LINCOVÁ, D., FARGHALI, H., KRŠIAK, M., et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. Druhé doplněné a přepracované vydání, 2007. Praha: Galén, 672s., ISBN: 978 – 80 – 7262 – 373 – 0.
- [22] SCHWARZ, S., CLOECKAERT, A., ROBERTS, M. C. 2006. Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: Aarestrup, F. M. (ed.), *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. s. 73-98. ASM Press Washington, D. C.
- [23] EVANS, M. E., D. J. FEOLA a R. P. RAPP, 1999. Polymyxin B Sulfate and Colistin: Old Antibiotics for Emerging Multiresistant Gram-Negative Bacteria. *Annals of Pharmacotherapy*. 1999(33), 960-967. DOI: 10.1345
- [24] BUCHANAN, G. R., J. D. SIEGEL, S. J. SMITH, B. M. DE PASSE: Oral penicillin prophylaxis in children with impaired splenic function: a study of compliance. *Pediatrics*, 70, 1982, s. 926.
- [25] FARBER, B. F., G. M. ELIOPOULOS, J. I. WARD et. al. : Resistance to penicillin-streptomycin synergy among clinical isolates of viridans streptococci. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 24, 1983, 871.
- [26] HURST, A., 1981. Nisin. *Advances in Applied Microbiology*. 85-126. DOI: 10.1016/S0065-2164(08)70342-3.
- [27] MENDEZ-VILAS, A. Current research, technology and education topics in applied mikrobiology and microbial biotechnology. Badajoz, Spain: Formatex Research Center, 2010, s. 1395-1404. ISBN 9788461461950.
- [28] MULLER, J., D. MACEACHRAN, H. BURD, et al. Engineering of *Ralstonia eutropha* H16 for Autotrophic and Heterotrophic Production of Methyl Ketones. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, 79(14), 4433-4439. DOI: 10.1128/AEM.00973-13. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.00973-13>.
- [29] REINECKE, F., STEINBÜCHEL, A.: *Ralstonia eutropha* strain H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers. *Journal of Molecular Mikrobiology and Biotechnology* [online]. 2009, vol. 16, pp. 91-108 [cit. 2017-12-12].
- [30] BacMap Genome Atlas [online], [cit. 2017-12-21]. Dostupné z: <http://bacmap.wishartlab.com/organisms/1407>
- [31] OBRUCA, S., MAROVA, I., SVOBODA, Z., MIKULÍKOVÁ, R. Use of Controlled Exogenous Stress for Improvement of Poly(3-hydroxybutyrate) Production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiologica* [online], 2010, 55(1), s. 17-22. ISSN: 0015-5632.
- [32] SUDESH, K., H. ABE a Y. DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* [online]. 2000, 25(10), 1503-1555 DOI: 10.1016/S0079-6700(00)0035-6. ISSN 00796700.
- [33] REDDY, C.S.K., R. GHAI, RASHMI a V.C. KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*. 2003, vol. 87, issue 2, s. 137-146.

- [34] MICHAEL, F., STEPHEN, D.: Encyclopedia of bioprocess technology – fermentation, biocatalysis and bioseparation, volumes 1-5 [online]: John Wiley & Sons, Inc, 1999.
- [35] KOLLER, M., et al.: Biotechnological polymer synthesis: a review, Food Technol. Biotechnol. 48(3) 255-269 (2010).
- [36] KESSLER, B. a B. WITHOLT. Poly(3-hydroxyalkanoates). [Encyclopedia of Bioprocess Technology [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2002. DOI: 10.1002/0471250589.ebt168. ISBN 0471250589, 16
- [37] JÍLEK, P., BUCHTA, V., et al. Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví. 1. vydání Praha, Karolinum (2002) 104 s. 80-246-0459-0
- [38] NOVÁK, J., G. BASAŘOVÁ, J. FIALA a P. DOSTÁLEK. Průtoková cytometrie ve výzkumu kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a její aplikace v praxi. Chemické listy. 2008, č. 102, s. 183-187. ISSN 1213-7103. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008\\_03\\_183-187.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_03_183-187.pdf)
- [39] BRANSKÁ, B., M. LINHOVÁ, P. PATÁKOVÁ, L. PAULOVÁ a K. MELZUCH. Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční analýzy. Chemické listy. 2011, č. 105, s. 586-593. ISSN 1213-7103. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011\\_08\\_586-593.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_586-593.pdf)

## 7 PŘÍLOHY

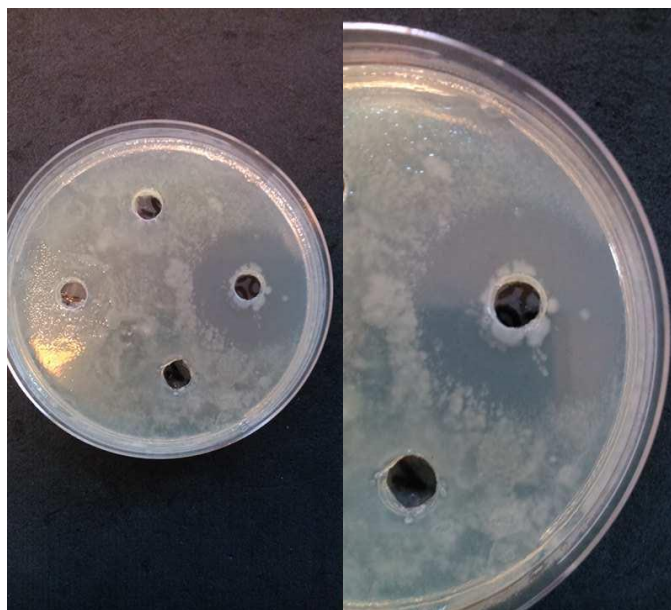


**Příloha 1:** Počítání kolonií na miskách pro streptomycin (vlevo H16, vpravo PHB<sup>-4</sup>)

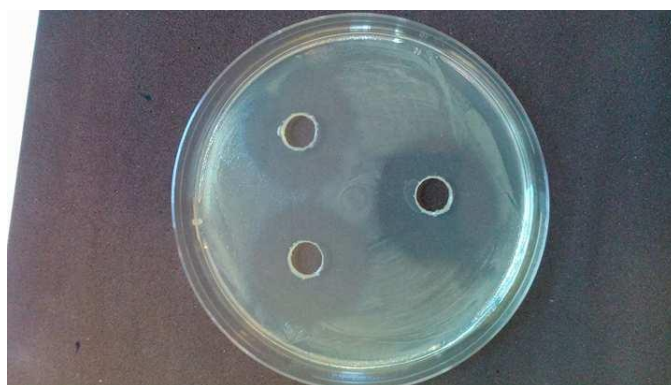


**Příloha 2:** Porovnání histogramů pro streptomycin (50%) z oranžového kanálu (nahore H16)





**Příloha 3: Penicilin 50% (H16)**



**Příloha 4: Penicilin 50% (PHB<sup>-4</sup>)**